

Entwicklung analytischer Methoden und multivariater statistischer Modelle zur Differenzierung von Barrique Weinen und Weinen, die mit Eichenholzchips behandelt wurden

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Magdalena Klein
aus Bad Neustadt a. d. Saale

1. Referent: Professor Dr. Peter Winterhalter
2. Referent: apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt
eingereicht am: 25.05.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am: 10.09.2012

Druckjahr 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Kenntnisstand	9
2.1	Stand der Forschung	9
2.2	Rechtsvorschriften	11
2.3	Herstellung und Verwendung von Barriquefässern	11
2.4	Herstellung und Verwendung von Eichenholzchips	14
2.5	Zusammensetzung von Eichenholz	15
2.6	Flüchtige Verbindungen	17
2.6.1	Furan Derivate	17
2.6.2	Aromatische Aldehyde	17
2.6.3	Phenole	18
2.6.4	Lactone	18
2.7	Schwerflüchtige Verbindungen	21
2.7.1	Hydrolisierbare Tannine	23
2.7.2	Kondensierte Tannine	23
2.8	Analytik	24
2.8.1	Festphasenextraktion	24
2.8.2	Gas Chromatographie - Massenspektrometrie	25
2.8.3	HPLC	25
2.8.4	NMR Spektroskopie	26
2.8.5	Aufbau eines NMR Spektrometers	26
2.8.6	NMR-Lösungsmittelunterdrückung	27
2.8.7	NOE Differenzspektren	28
2.8.8	Bucketierung von NMR Spektren	29
2.9	Statistik	31
2.9.1	Pattern Recognition	31
2.9.2	Hauptkomponentenanalyse	32
2.9.3	Lineare Diskriminanzanalyse	35
2.9.4	Partial Least Squares Analyse	36

2.9.5	Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)	37
3	Ergebnisse und Diskussion	39
3.1	GC-MS Analytik	39
3.1.1	Quantifizierung	39
3.1.2	Modellbildung mit authentischen Proben	42
3.1.3	Chips Alterungsversuche	61
3.1.4	Holzfassversuche mit kleinen getoasteten Eichenholz-fässern	73
3.1.5	Sauerstoff/SO ₂ -Versuch	78
3.1.6	Untersuchung von Inhaltsstoffen in Extrakten von Eichenholzchips Modellweinen	87
3.2	HPLC und Photometrische Analytik	99
3.2.1	HPLC Methodenentwicklung	99
3.2.2	HPLC Quantifizierung	101
3.2.3	Photometer Methodenentwicklung	101
3.2.4	Statistische Auswertung	102
3.2.5	1. Modell - HPLC-DAD	103
3.2.6	2. Modell - HPLC-DAD+Farbmessung	107
3.3	NMR-Analytik	112
3.3.1	NMR-Messungen nach Festphasenextraktion	114
3.3.2	NMR-Messungen mit Mehrfachunterdrückung	115
3.3.3	Validierung der NMR Methode mit Mehrfach-Lösungsmittelunterdrückung	117
4	Experimenteller Teil	126
4.1	GC-MS	126
4.1.1	Chemikalien	126
4.1.2	Lösungen und Weine für Modellversuche	127
4.1.3	Standardlösungen	127
4.1.4	GC-MS Gerät	127
4.1.5	GC-MS SPE-Methode	127
4.1.6	GC-MS flüssig/flüssig-Extraktion	128
4.1.7	Chromatographische Bedingungen SPE-Methode	128
4.1.8	Chromatographische Bedingungen flüssig/flüssig-Extraktion	129
4.1.9	Probenvorbereitung für die SPE-Methode	129
4.1.10	Probenvorbereitung für die flüssig/flüssig-Extraktions Methode	130

4.1.11	Identifizierung und Quantifizierung der flüchtigen Stoffe nach SPE Aufarbeitung	131
4.1.12	Identifizierung und Quantifizierung der flüchtigen Stoffe nach flüssig/flüssig-Extraktion	131
4.1.13	Kalibrierkurven der flüchtigen Stoffe für Weine und Modelllösungen	131
4.2	HPLC	134
4.2.1	Chemikalien	134
4.2.2	Standardlösungen	134
4.2.3	HPLC-DAD	135
4.2.4	Chromatographische Bedingungen	136
4.2.5	Farbmessung	136
4.2.6	Probenvorbereitung für die Methodenentwicklung	137
4.2.7	Mixstammlösung	137
4.2.8	Kalibrierkurven der schwerflüchtigen Stoffe	138
4.2.9	Identifizierung und Quantifizierung der schwerflüchtigen Stoffe	138
4.2.10	Probenvorbereitung zur Farbmessung	139
4.3	NMR	140
4.3.1	Chemikalien	140
4.3.2	Standardlösungen NMR	140
4.3.3	NMR	141
4.3.4	Spektroskopische Bedingungen	142
4.3.5	Probenvorbereitung für die Methodenentwicklung mittels SPE	142
4.3.6	Probenvorbereitung für die Methodenentwicklung mit Mehrfach-Lösungsmittelunterdrückung	143
4.3.7	Temperaturkalibrierung	143
4.3.8	NMR Experimente	143
4.4	Proben	147
4.4.1	Eichenholzchips und Eichenholzfässer für Modellversuche .	147
4.4.2	Weine	148
4.5	Statistik	148
4.5.1	Statistik GC-MS und HPLC	148
4.5.2	Statistik NMR	149

6	Literaturverzeichnis	156
7	Danksagung	177
	Anhang	179

Abbildungsverzeichnis

2.1	Barriquefässer im Weinkeller	13
2.2	Abbildung A zeigt leicht getoastete Eichenholzchips, die Abbildung B zeigt stark getoastete Eichenholzchips	15
2.3	Flüchtige Holzaromastoffe mit Furangrundgerüst	17
2.4	Flüchtige Holzaromastoffe mit Phenolgrundgerüst	19
2.5	Die beiden wichtigsten Lactone (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)- β -Methyl- γ -octalacton (<i>cis</i> -Whiskylacton) und (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- β -Methyl- γ -octalacton (<i>trans</i> -Whiskylacton)	20
2.6	Precursoren der Whiskylactone	21
2.7	Schwerflüchtige Holzaromastoffe mit Phenolgrundgerüst	22
2.8	Die Grundbausteine der hydrolysierbaren Tannine - Gallussäure und Ellagsäure	23
2.9	Die beiden bekanntesten Vertreter der Grundbausteine von kondensierten Tanninen - (+)-Catechin und (-)-Epicatechin	24
2.10	Ein Spektrenausschnitt aus der ^1H NMR Messung eines mit Chips versetzten Weines und eines Barrique Weines mit der dazugehörigen Bucketierung mit Gewichtungprofil der einzelnen Buckets. . .	30
2.11	Modell einer Principal Component Analysis. Die erste PC liegt entlang der größten Varianz der Datenpunkte. Die zweite PC liegt orthogonal auf der ersten.	33
2.12	PLS Methode: \mathbf{X} wird durch seine Scores \mathbf{t} und \mathbf{Y} durch \mathbf{u} dargestellt. Eine erste Abschätzung von \mathbf{u} erhält man durch die Multiplikation mit \mathbf{X} um eine Abschätzung der <i>weights</i> von \mathbf{w}^T zu erhalten. Die <i>weights</i> sind normalisiert zur Länge 1 und zurück multipliziert durch \mathbf{X} um \mathbf{t} zu erhalten. Die <i>weights</i> von \mathbf{q}^T erhält man aus \mathbf{t} und \mathbf{Y} . Dies ergibt wiederum den neuen Vektor \mathbf{u} . Die Prozedur wird bis zur Konvergenz von \mathbf{t} wiederholt (Nach Westerhuis et al. (1998)). .	36
3.1	Fließdiagramm zur Aufarbeitung der Proben für die flüchtigen Holzinhaltsstoffe mittels SPE.	40

3.2	GC-MS Chromatogramm eines Weißweins mit Eichenholzchips. Die Identifizierung und Quantifizierung wurde über die Retentionszeit und die spezifischen Massenfragmente der einzelnen Komponenten durchgeführt. Beispielhaft sind die beiden Furan Derivate Furfurylalkohol und 5-Methylfurfural hervorgehoben.	41
3.3	Mittelwerte und Standardabweichungen von ausgesuchten flüchtigen Verbindungen	46
3.4	PCA Scoresplot der authentischen Weine. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Proben bezüglich der önologischen Verfahren (Chips oder Barrique).	47
3.5	PCA Loadingsplot der authentischen Proben. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen Substanzen bezüglich der einzelnen Faktoren.	48
3.6	LDA Scoresplot der authentischen Weine. Das Koordinatensystem wird durch die Diskriminanzvariable der LDA und die erste Hauptkomponente der PCA erstellt	49
3.7	LDA Scoresplot der authentischen Weine zusammen mit den eingesetzten Test Weinen. Korrekte Klassifizierung der Barrique Weine und der Chips Weine. Die Weine, die gleichzeitig im Barrique mit Eichenholzchips behandelt wurden, liegen am Rand der Barrique Gruppe	51
3.8	LDA Scoresplot der authentischen Weine zusammen mit den eingesetzten Test Weinen und den Handelsweinen. Die Handelsweine werden korrekt klassifiziert.	52
3.9	Erklärte Y-Varianz der einzelnen Faktoren der PLS Analyse der authentischen Proben	54
3.10	PLS Scores Plot der authentischen Proben. Das Koordinatensystem ist aufgespannt aus den zusammengefassten ersten 10 Faktoren der PLS Analyse und der ersten Hauptkomponente der PCA.	55
3.11	PLS Loadingsplot der authentischen Proben. Die Furanverbindungen A, C und G, sowie die Lactone I, K und Q und die aromatischen Aldehyde N, P, R und T tragen entscheidend zur Modellbildung bei.	56
3.12	PLS Prediction mit 10 Test Proben. Aufgetragen sind die zusammengefassten ersten 10 PLS Faktoren gegen die erste Hauptkomponente der Hauptkomponentenanalyse.	59

3.13 PLS Prediction mit 93 Proben, die sich aus den 10 Test Proben und den 83 Handelsproben zusammensetzen. Aufgetragen sind die zusammengefassten ersten 10 PLS Faktoren gegen die erste Hauptkomponente der Hauptkomponentenanalyse.	60
3.14 PCA Scoresplot: Chipsalterungsversuch mit Rotweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Proben bezüglich gealterten und nicht gealterten Chips.	65
3.15 PCA Loadingsplot: Chipsalterungsversuch mit Rotweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen Variablen bezüglich der einzelnen PCs.	66
3.16 PLS Scoresplot: Chipsalterungsversuch mit Weißweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Proben bezüglich gealterten und nicht gealterten Chips.	68
3.17 PLS Loadingsplot: Chipsalterungsversuch mit Weißweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Variablen bezüglich der beiden ersten Faktoren der PLS Analyse. Die Variablen, die mit ○ gekennzeichnet sind, tragen entscheidend zur Trennung der beiden Gruppen bei.	69
3.18 PLS Scoresplot: Chipsalterungsversuch der Weißweine mit reduzierter Variablenzahl.	70
3.19 PLS Scoresplot: Chipsalterungsversuch mit Rotweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Proben bezüglich gealterten und nicht gealterten Chips.	71
3.20 PLS Loadings: Chipsalterungsversuch mit Rotweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Variablen bezüglich der beiden ersten Faktoren. Die Variablen, die mit ○ gekennzeichnet sind, sind die wichtigsten Variablen und tragen entscheidend zur Trennung der beiden Gruppen bei.	72
3.21 PLS Scoresplot: Chipsalterungsversuch der Rotweine mit reduzierter Variablenzahl.	73
3.22 Verlauf der Konzentrationen bei den einzelnen Entnahmetermeninen von <i>cis</i> - bzw. <i>trans</i> -Whiskylacton in den 20 L Eichenholzfässern der Hersteller Müller und Aßmann.	77
3.23 Verlauf der Konzentrationen bei den einzelnen Entnahmetermeninen von Vanillin und Syringaaldehyd in den 20 L Eichenholzfässern der Hersteller Müller und Aßmann.	77

3.24 Verlauf der Konzentrationen bei den einzelnen Entnahmetermenen von Furfurylalkohol bzw. 4-Methylguaiacol nach Sauerstoffzugabe.	81
3.25 Verlauf der Konzentrationen bei den einzelnen Entnahmetermenen von Syringaaldehyd bzw. Ethylvanillat nach Sauerstoffzugabe.	81
3.26 Scoresplot der PLS Analyse der Proben im SO ₂ -Versuch. Hervorgehoben ist die Probencodierung schwach bzw. ausreichend geschwefelt.	83
3.27 Scoresplot der PLS Analyse der Proben im SO ₂ -Versuch. Aufgetragen sind die ersten beiden Faktoren der PLS Analyse. Hervorgehoben ist die Probencodierung ohne bzw. mit Sauerstoffbehandlung.	84
3.28 Loadingsplot der PLS Analyse der Proben im SO ₂ -Versuch. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Variablen bezüglich der beiden ersten Faktoren der PLS Analyse. Die Variablen, die mit ○ gekennzeichnet sind, sind die wichtigsten Variablen und tragen entscheidend zur Trennung der beiden Gruppen bei. Die mit ● gekennzeichnete Variable entspricht der Y-Variable "mit bzw. ohne Sauerstoffeintrag". Die mit ● gekennzeichnete Variable entspricht der Y-Variable "schwach bzw. ausreichend geschwefelt".	85
3.29 Scoresplot der PLS Analyse der Proben im SO ₂ -Versuch mit der Gruppenvariable "Toastungsgrad".	86
3.30 Reaktionsgleichung zum Abbau von 2,4-Bis(<i>t</i> -butyl)phenol	89
3.31 Entstehung von drei Äquivalenten 2,4-Bis(<i>t</i> -butyl)phenol	90
3.32 Desaspidinol	90
3.33 Interner Standard: 4-Methoxybenzoesäure	100
3.34 Hauptkomponentenanalyse der Ergebnisse der HPLC Messungen und der Farbmessungen. Aufgetragen sind die beiden ersten Hauptkomponenten PC1 und PC2. Die Kennzeichnung der einzelnen Proben in die beiden Gruppen Chips Weine und Barrique Weine zeigt keine Trennung.	103
3.35 Hauptkomponentenanalyse der Ergebnisse der HPLC Messungen und der Farbmessungen. Aufgetragen sind die beiden ersten Hauptkomponenten PC1 und PC2. Die Kennzeichnung der einzelnen Proben in die beiden Gruppen Rotweine und Weißweine zeigt eine deutliche Trennung.	104

3.36 Diskriminanzanalyse der authentischen Proben mit den HPLC-Daten. Die Diskriminanzfunktion ist gegen die erste Hauptkomponente aufgetragen. Probencodierung „mit Chips“ gegen „ohne Chips“ (Quelle: Vogel (2010))	107
3.37 Diskriminanzanalyse der authentischen Proben mit den HPLC- und Farbdaten. Diskriminanzfunktion aufgetragen gegen die erste Hauptkomponente. Probencodierung „mit Chips“ und „ohne Chips“ (Quelle: Vogel (2010)).	110
3.38 ^1H NMR Spektren eines Rotweins. Das Spektrum in Orange ist ohne Lösemittelunterdrückung aufgenommen. Das braune Spektrum ist mit Mehrfach-Lösemittelunterdrückung aufgenommen.	113
3.39 Entwicklung und Verbesserung der NMR Methoden	114
3.40 PCA Scoresplot der authentischen Proben, die mittels SPE Methode aufgearbeitet und anschließend mit ^1H NMR gemessen wurden. Es ist eine deutliche Trennung zwischen den Chips Weinen und den Barrique Weinen erkennbar.	115
3.41 Spektren zum Vergleich der einzelnen Messungen mehrfach aufgearbeiteter Proben.	118
3.42 Ausschnitt aus den NMR Spektren zweier Weine (Barrique Wein und Chips Wein) mit Mehrfachunterdrückung. Hervorgehoben ist der aromatische Bereich.	119
3.43 ^1H -NMR Spektrenvergleich von je einem Rot- und Weißwein. . . .	120
3.44 ^1H -NMR Spektrenvergleich von einem mit Eichenholzchips versetzten Silvaner aus den Jahren 2006 und 2007.	121
3.45 PCA Scoresplot der authentischen ^1H -NMR Proben. Trennung in Rot- bzw. Weißwein ist erkennbar.	122
3.46 20 Faktoren der PLS aufgetragen gegen die erste Hauptkomponente PC1 der authentischen Proben, die mittels NMR gemessen wurden.	123
3.47 20 Faktoren der PLS aufgetragen gegen die erste Hauptkomponente PC1 der authentischen Proben und B-authentischen Proben, die mittels NMR gemessen wurden.	124
3.48 Zuordnung der unbekannten Proben zu einer der beiden Gruppen, die mit den Variablen 1 für Barrique und -1 für Chips gekennzeichnet sind.	125
4.1 Puls Sequenz des zgpr Experiments	145
4.2 Puls Sequenz des Noesy Experiments	145
4.3 Puls Sequenz des Jres Experiments	146

4.4 Puls Sequenz des zg30 Experiments	146
---	-----

Tabellenverzeichnis

3.1	Kalibrierbereich GC-MS in $\mu\text{g/L}$	42
3.2	Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen in $\mu\text{g/L}$ der authentischen Weine aufgeteilt in Chips Weine und Barrique Weine. .	45
3.3	Kreuzvalidierung der LDA Analyse mit authentischen Proben	50
3.4	Eingesetzte Proben für die PLS Analyse der GC-MS Ergebnisse . . .	53
3.5	Ergebnisse der PLS Prediction mit 10 Test Proben zur Überprüfung des erstellten Modells mit authentischen GC-MS Werten	58
3.6	Verwendete Chipssorten für die Alterungsversuche	62
3.7	Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Weißweine mit frischen bzw. gealterten Eichenholzchips	63
3.8	Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Rotweine mit frischen bzw. gealterten Eichenholzchips	63
3.9	Durchschnittliche Konzentrationen (in $\mu\text{g/L}$) flüchtiger Stoffe in Modellweinen (13 % vol.) nach Erstbelegung von kleinen Barriquefässern (20 L) sowie in handelsüblichen Barriqueweinen.	74
3.10	Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Modellweine in den beiden 20 L Eichenholzfässern der Hersteller Aßmann und Müller.	76
3.11	Übersicht der Ansätze zur Prüfung des Einflusses von Sauerstoff und Schwefel auf das Profil flüchtiger Stoffe im Holz.	79
3.12	Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Weine aus dem Sauerstoff/SO ₂ -Versuch.	80
3.13	Übersicht der PLS-Codierung zur Prüfung des Einflusses von Sauerstoff und Schwefel auf das Profil der flüchtigen Stoffe im Holz. In Spalte Y1 steht die Codierung 1 für Weine ohne Sauerstoffzugabe und -1 für Weine mit Sauerstoffzugabe. Schwach geschwefelte Proben sind in Spalte Y2 mit 1 und ausreichend geschwefelte Proben mit -1 gekennzeichnet.	82
3.14	Verwendete Chipssorten für die Untersuchung von Modellweinextrakten	87

3.15 Vergleich der Festphasen- mit Pentan/Dichlormethan-Extraktion anhand der Modellweine AM, FM und DM	91
3.16 Verhältnis von ansonsten strukturgleichen Syringyl- zu Guaiacylderivaten nach Festphasen- und Pentan/Dichlormethan-Extraktion . .	93
3.17 Vergleich der Konzentrationen ausgewählter flüchtiger Verbindungen der Modellweinlösungen DM (Eichenholzchips deutscher Herkunft), FM (Eichenholzchips französischer Herkunft) und AM (Eichenholzchips amerikanischer Herkunft) nach SPE Aufarbeitung. .	94
3.18 Verhältnis der beiden Lactone <i>trans</i> - bzw. <i>cis</i> -Whiskylacton in den Modellweinen DM (Eichenholzchips deutscher Herkunft), FM (Eichenholzchips französischer Herkunft) und AM (Eichenholzchips amerikanischer Herkunft).	95
3.19 Vergleich der Modellweinlösungen mit medium getoasteten (AM) und ungetoasteten (NT) amerikanischen Eichenholzchips nach SPE Aufarbeitung	96
3.20 Vergleich der Aromastoffkonzentration nach unterschiedlicher önologischer Behandlung nach SPE Aufarbeitung	97
3.21 Ausgewählte Variablen nach der Analyse im 1. Modell mit den Ergebnissen der HPLC Messung (Quelle: Vogel (2010)).	105
3.22 Klassifizierungstabelle 1. Modell (Quelle: Vogel (2010)).	106
3.23 Ausgewählte Variablen nach der Analyse im 2. Modell mit den Ergebnissen aus der HPLC-Messung und der Farbmessung (Quelle: Vogel (2010)).	108
3.24 Klassifizierungstabelle 2. Modell (Quelle: Vogel (2010)).	109
3.25 Zuordnung der Handelsweine im 2. Modell mit den Ergebnissen der HPLC Messung und der Farbmessung (Quelle: Vogel (2010)). . . .	111
4.1 Verwendete Referenzsubstanzen für die GC-MS Methode mit CAS-Nummer und Hersteller.	126
4.2 Charakteristische Massenfragmente der verwendeten flüchtigen Aromastoffe; fettgedruckte Massen werden zur Quantifizierung eingesetzt.	130
4.3 Konzentrationen der einzelnen Referenzsubstanzen in den Kalibrierlevels für die Quantifizierung der Holzinhaltsstoffe in Weinen und Modelllösungen, wobei sich die Spaltennamen Std 0 - Std 8 auf die einzelnen Kalibrierlevel beziehen und der Spaltenname WF für die Konzentration der Wiederfindung steht.	132
4.4 Wiederfindungsraten der GC-MS Messungen	133

4.5	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen in $\mu\text{g/L}$ der GC-MS Messungen	134
4.6	Verwendete Referenzsubstanzen für die HPLC Methode	135
4.7	Gradient der HPLC Methode	137
4.8	Konzentrationen der Substanzen in der Mixstammlösung	138
4.9	Kalibrierlevel der einzelnen Standards für die HPLC Messungen . .	139
A.1	Übersicht über die Weine, die mittels GC-MS gemessen wurden und zur Modellbildung eingesetzt wurden.	187
A.2	Übersicht über die Weine, die mittels HPLC gemessen wurden, deren Farbe bestimmt wurde und die zur Modellbildung eingesetzt wurden.	192
A.3	Übersicht über die Weine, die mittels ^1H NMR gemessen wurden und zur Modellbildung eingesetzt wurden.	200

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ALL	Amerikanische Eichenholzchips, large, light toasted
ALM	Amerikanische Eichenholzchips, large, medium toasted
AM	Oakyvin, medium getoastet, amerikanische Eiche
ASH	Amerikanische Eichenholzchips, small, heavy toasted
ASM	Amerikanische Eichenholzchips, small, medium toasted
ATMA	automatisches Tuning und Matching
% B	prozentualer Blauanteil
°C	Grad Celsius
D	Dalton
DLR	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum
DM	Oakyvin, medium getoastet, deutsche Eiche
FID	Free Induction Decay
FLH	Französische Eichenholzchips, large, heavy toasted
FLM	Französische Eichenholzchips, large, medium toasted
FM	Oakyvin, medium getoastet, französische Eiche
FSH	Französische Eichenholzchips, small, heavy toasted
FSM	Französische Eichenholzchips, small, medium toasted
% G	prozentualer Gelbanteil
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry (Gaschromatographie-Massenspektrometrie)
HMF	5-Hydroxymethylfurfural

HMPA	1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-aceton
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detection (Hochleistungsflüssigchromatographie-Diode Array Detektion)
HT	Heavy Toasted (stark getoastet)
I	Intensität
ISFET	ionensensitiver Feldeffekttransistor
J	Kopplungskonstante [Hz]
JRES	zweidimensionales J-gekoppeltes ^1H NMR Experiment
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Kaliumdisulfit
LDA	Lineare Diskriminanz Analyse
LWG	Bayerische Landesanstalt für Wein- und Gartenbau, Veitshöchheim
LT	Light Toasted (leicht getoastet)
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladungszahl
(M)Hz	(Mega)Hertz
min	Minuten
MT	Medium Toasted (medium getoastet)
N	Nuance
NaN_3	Natriumazid
NOE	Nuclear Overhauser Effect (Kern Overhauser Effekt)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Kern Resonanz Spektroskopie)
NT	Best Oak [®] , nicht getoastet (NT)
OPLS-DA	Orthogonale Partial Least Squares Diskriminanzanalyse
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
Pe-/Di-Extraktion	Pentan-/Dichlormethan-Extraktion
PEEK	Polyetheretherketon

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionen Konzentration
PLS	Partial Least Squares Analysis
PLS-DA	Partial Least Squares Diskriminanzanalyse
ppm	parts per million
PR	Pattern Recognition (Mustererkennung)
% R	prozentualer Rotanteil
SMRS	Standard Metabolic Reporting Structure
SNIF-NMR	site-specific natural isotope fractionation nuclear magnetic resonance
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
Std	Standard
tert	tertiär
TSP	Natriumtrimethylsilylpropionat (NMR Referenzsubstanz)
% vol.	Volumenprozent
WF	Wiederfindung
zg30	zero go 30 Grad Puls Experiment
zgpr	zero go presaturation Experiment

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Weine, die im Barrique gelagert waren von solchen zu unterscheiden, die mit Eichenholzchips versetzt waren. Aufgrund der Tatsache, dass die beiden Methoden mit den gleichen Grundmaterialien (Eichenholz) arbeiten ist es schwierig eine eindeutige Verbindung zu finden, die den Unterschied ausmacht. Allerdings bestehen bei den beiden Methoden einige grundlegende Unterschiede, die sich auf das Profil der Holzinhaltsstoffe, die in den Wein migrieren auswirken.

Diese Unterschiede bestehen im Verhältnis der Oberfläche Holz zur Oberfläche Wein, in der Kontaktzeit des Holzes mit dem Wein und in der unterschiedlichen Röstungsart des Holzes vor dem Einsatz im Wein. Der Fokus der Analytik wurde in dieser Arbeit auf flüchtige und nicht- bzw. schwerflüchtige Verbindungen die aus dem Holz in den Wein übergehen gelegt, welche mittels GC-MS, HPLC-DAD und ^1H NMR untersucht wurden. Bei den beiden erstgenannten Analysensystemen wurden in der Methodenentwicklung anhand von Referenzsubstanzen Kalibrierungen erstellt und anschließend die Gehalte dieser Substanzen in den Proben bestimmt. Es wurde also eine targeted Analyse durchgeführt. Bei der ^1H NMR wurde zunächst eine Methode zur Messung der Weine entwickelt und anschließend die gemessenen Spektren der Weine direkt für die statistischen Berechnungen eingesetzt, es handelt sich hierbei um eine non-targeted Analyse. Zunächst wurden authentische Weine analysiert und mit den erhaltenen Ergebnissen statistische Berechnungen durchgeführt. Für jede Analysenmethode wurden jeweils Modelle berechnet, die anschließend zur Klassifizierung von unbekannten Proben herangezogen wurden.

Die Modelle wurden mit verschiedenen statistischen Methoden erstellt. Zunächst wurde mittels Hauptkomponentenanalyse eine Mustererkennungsanalyse mit Messergebnissen durchgeführt. Anschließend wurden Klassifizierungsanalysen mittels linearer Diskriminanzanalyse und der Partial Least Squares Regression durchgeführt.

Mit den Ergebnissen der drei Analysenmethoden war es möglich eine Differenzierung der authentischen Proben mit den erstellten statistischen Modellen zu erzielen. Auch die anschließende Überprüfung der Modelle verlief erfolgreich. Abschließend konnten unbekannte Weinproben mit diesen Modellen erfolgreich klassifiziert werden. Somit können die entwickelten Methoden und statistischen Modelle zukünftig zur Klassifizierung von Proben in der Routine eingesetzt wer-

den.

Ort, Datum

Unterschrift

Abstract

The aim of this thesis was to distinguish between wines aged in Barriques and wines produced with oak chips. Due to the fact that both methods work with the same basic material (oak wood) it is a challenge to find an impact compound which makes the difference. But there exist in both methods basic differences, which affect the profile of the wooden compounds that migrate into the wine.

These differences are the ratio of the wood surface to the wine surface, the contact time of the wood with the wine and the different roasting procedure of the wood before the input in the wine. The main focus in the analytic was layed on volatile and semi/non volatile compounds which cross over from the wood into the wine. These compounds were analyzed with GC-MS, HPLC-DAD and ^1H NMR. With the two first analytical systems calibrations of reference substances were performed, and then the concentration of those substances in real samples were analyzed. This is a so called targeted analysis. A method was developed for the ^1H NMR measurements of wine samples. The resulting spectra were directly used for the statistical analysis. This is a so called nontargeted analysis.

For a start, authentic wine samples were analyzed and the statistical analysis was performed with the measured results. For each method a separate statistical model was performed, which were used for the classification of unknown wine samples.

The models were created using different statistical methods. First, a principal component analysis was done to a pattern in the samples. Then classification analyses were performed using linear discriminant analysis and partial least squares regression. For all three methods of analysis it was possible to achieve a differentiation of the authentic samples. The subsequent review of the models was successful and the analyzed results of unknown samples could be classified with these models. Thus, the developed methods and statistical models can be used to classify samples in future routine application.

Ort, Datum

Unterschrift

1 Einleitung

Die Verwendung von Holz in der Weinbereitung hat eine sehr lange Tradition. Schon bei den Römern wurden Holzfässer zur Lagerung und zum Transport von Wein eingesetzt. Die Bauweise der Fässer in Walzenform hat den Vorteil, dass der Transport von einem Mann alleine durchgeführt werden kann. Außerdem ist eine Stapelung sowohl auf der gerundeten als auch auf der flachen Seite möglich.

Es wurden im Laufe der Zeit unterschiedliche Holzsorten ausprobiert. Es zeigte sich jedoch, dass Eichenholz aufgrund der Zusammensetzung und Beschaffenheit am besten zur Weinlagerung geeignet ist (Johnson 1989). Man hat festgestellt, dass die Verwendung von Eichenholzfässern einen positiven Effekt auf die Eigenschaften des Weines bezüglich der Farbe, des Aromas, der Reinheit und der Haltbarkeit hat. Der Nachteil, den die Fässer mit sich brachten, war einerseits der finanzielle Aspekt und andererseits die Gefahr eines mikrobiellen Befalls des Weines. Daher wurden in den 1950er und 1960er Jahren inerte Tanks zur Lagerung von qualitativ hochwertigen Weinen eingeführt (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Auch war der Übertrag von Aromen aus dem Holz in den Wein lange Zeit unerwünscht und die Fässer wurden vor dem ersten Befüllen lange gewässert und gebrüht (weingrün gemacht), bis alle unerwünschten Gerbstoffe und Aromen aus dem Holz ausgelaugt waren (Flak et al. 2004). Erst in den 1970er Jahren wurde in Kalifornien begonnen, das typische Aroma getoasteter Eiche in das Bouquet der Weine einzubauen, woraus sich nach und nach ein Markt von im Barriquefass ausgebauten Weinen etabliert hat. In Deutschland waren solche Weine bis in die 1990er Jahre vom Verbraucher zunächst nicht akzeptiert. Seit dieser Zeit wächst der Markt von Weinen mit Holztönen. Im Handel wird seitdem ein breites Spektrum von Weinen angeboten, das von einer schwach erkennbaren bis hin zu einer intensiven Barriquenote reicht (Steidl und Leindl 2001).

Während der Reifung im Barriquefass werden flüchtige und nicht flüchtige Substanzen, wie zum Beispiel Vanillin, cis- und trans- β -Methyl- γ -octalacton (Eichen- oder auch Whiskylacton genannt) oder Eugenol aus dem Holz gelöst, die einen entscheidenden Einfluss auf das Aroma des Weins haben (Fernández de Simón et al. 2006). Das Eichenholz spielt aber bei der Herstellung von Wein nicht nur eine wichtige Rolle für das Aroma. Durch die Oxidation verschiedener Inhaltsstoffe durch den Sauerstoff, der durch die Poren des Holzfasses gelangt, wird die Adstringenz reduziert und die Farbe verändert sich (Bozalongo et al. 2007).

Da die Lagerung im Barrique viel Erfahrung und Zeit in Anspruch nimmt, eine kostspielige Angelegenheit ist und ein Barriquefass nur begrenzt wieder verwendbar ist, wurde versucht, auf anderen Wegen das Aroma und die positiven Eigenschaften von Eichenholz auf den Wein zu übertragen. Ein Merkmal von Holzfäsern ist die Durchlässigkeit für bestimmte Stoffe. Diese Eigenschaft kann einerseits zum Auslaufen von Wein führen, andererseits aber auch zu Kontaminationen, welche Fehlparomen hervorrufen können. Daher wurde versucht, auf inerte, dichte Gebinde wieahltanks zurückzugreifen (Dinsmoor Webb 1974; Garde-Cerdán und Ancín-Azpilicueta 2006). Jedoch ist gerade diese Durchlässigkeit der Holzfässer von großer Wichtigkeit für den Wein, da der Sauerstoff, der in das Fass gelangt, für farb- und aromarelevante Oxidationsreaktionen verantwortlich ist.

Eine häufig angewendete Methode ist die Verwendung von Eichenholzstücken, sogenannten Eichenholzchips. Diese bestehen aus dem gleichen Grundmaterial wie Barriquefässer, allerdings ist die Herstellung und der Einsatz dieser Chips wesentlich kostengünstiger, einfacher und weniger zeitintensiv (Fernández de Simón et al. 2009; Frangipane et al. 2007). Der Preis pro Fass, welches nach dreimaliger Belegung bereits ausgelaugt ist (Flak et al. 2002; Steidl und Leindl 2001), beträgt zwischen 400-700 €, wohingegen Eichenholzchips zwischen 10-30 € pro Kilogramm kosten. Eichenholzchips werden in Konzentrationen von etwa 50-250 g/hL eingesetzt. Man kann davon ausgehen, dass für einen Barriquewein Mehrkosten von etwa 0,5-1,0 € pro Liter Wein entstehen, wohingegen bei einem mit Chips versetztem Wein nur etwa 0,03-0,10 € an zusätzlichen Kosten entstehen.

Ein weiterer Kostenfaktor, der berücksichtigt werden muss, ist die Kontaktzeit des Weins mit dem Holz. Eichenholzchips werden im Durchschnitt nur zwischen 2 und 8 Wochen im Wein belassen, wohingegen die Mindestverweildauer für Weine, die im Barrique ausgebaut werden, bei 3 Monaten (Weißweine) bzw. 6 Monate (Rotweine) liegt (Weinverordnung 2009). Durch den Platz, der zum längeren Lagern in den Barriquefässern benötigt wird, entstehen weitere Kosten. Barriquefässer lassen sich zwar in Lagen von bis zu 5 Fässern stapeln, jedoch ist ein ungehinderter Zugriff in diesem Fall schlecht möglich. Werden die Fässer nebeneinander gelagert, ist der Zugriff unproblematisch, dadurch wird jedoch mehr Platz benötigt. Bei einer zu trockenen Lagerung ist zusätzlich mit einem Schwund von bis zu 10 % des Weines zu rechnen. Bei einer optimalen Luftfeuchtigkeit beträgt der Verlust hingegen nur etwa 2 % (Steidl und Leindl 2001).

Werden die Eichenholzchips richtig eingesetzt, ist das gleiche Ergebnis wie beim Barriqueausbau erreichbar. Eine sensorische Unterscheidung von Weinen, die mit

Holzchips behandelt wurden und Weinen, die im Barrique gereift wurden, ist sehr schwierig und gelingt selbst erfahrenen Weinsensorikern nicht immer (Flak et al. 2002). Beim Ausbau mit Holzchips ist es wichtig, die Durchlässigkeit der Barriquefässer für Sauerstoff zu simulieren. Es besteht die Möglichkeit, den Wein im Stahltank mit Eichenholzchips zu versetzen und durch eine sogenannte Mikrooxygenierung (kontrollierter Sauerstoffeintrag in den Wein, ähnlich des Sauerstoffeintrags in Barriquefässern) Sauerstoff zuzufügen (Garde-Cerdán und Ancín-Azpilicueta 2006).

Die Verwendung von Eichenholzchips war bis 2006 in der Europäischen Union verboten. Seit dieser Zeit ist auch in Deutschland die Verwendung von Eichenholzchips zulässig, allerdings mit Einschränkungen (VERORDNUNG (EG) Nr. 606/2009; VERORDNUNG (EG) Nr. 607/2009). Qualitätsweinen beispielsweise darf keine Prüfnummer zugeteilt werden, wenn diese mit Eichenholzchips behandelt wurden. Außerdem dürfen bei Weinen, die mit Barriquefassausbau beworben werden, keine Eichenholzstücke in der Herstellung verwendet worden sein. Da die Verwendung von Eichenholzstücken in der Weinbereitung eine wesentliche Kostenersparnis darstellt, ist es wichtig, den Verbraucher davor zu schützen, falsch deklarierte Weine teuer einzukaufen.

Die vorliegende Arbeit wurde am bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Würzburg durchgeführt und widmet sich der Analytik von flüchtigen, schwerflüchtigen und nichtflüchtigen Stoffen in Weinen mit Eichenholzbehandlung. Anschließend folgt die multivariate statistische Auswertung zur Unterscheidung von Weinen, die im Barrique gelagert wurden von solchen, die mit Eichenholzstücken ausgebaut wurden.

Die Schwierigkeit der Unterscheidung von Weinen, die im Barrique ausgebaut wurden, von solchen, die mit Eichenholzchips behandelt wurden, liegt darin begründet, dass in beiden Fällen das gleiche Ausgangsmaterial verwendet wird. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, dass eine einzelne Verbindung (eine sogenannte Impactverbindung) für die Differenzierung der Weine verantwortlich ist. Allerdings sind Ansatzpunkte vorhanden, auf die eine Unterscheidung aufgebaut werden kann.

Die Kontaktzeit der Weine mit dem Holz variiert bei den einzelnen Methoden.

Weine, die im Barrique ausgebaut werden, müssen in Deutschland nach der Weinverordnung (Weinverordnung 2009) eine Mindestkontaktzeit aufweisen. Diese ist für Rotweine mit mindestens sechs Monaten und für Weißweine mit mindestens drei Monaten vorgegeben. Die Dauer des Einsatzes von Eichenholzchips ist jedoch nicht festgelegt. Diese werden nach ca. zwei bis acht Wochen aus dem Wein entfernt. Da die einzelnen Inhaltsstoffe, die in den Wein übergehen, unterschiedliches Migrationsverhalten aufweisen (Ferreira et al. 2006), ist dies ein Ansatz zur Unterscheidung von Barrique- und Chipsweinen.

Die Erhitzung des Holzes bei der Herstellung verläuft auf verschiedene Arten. Barriquefässer werden bei der Herstellung über offenem Feuer von innen erhitzt. Eichenholzchips dürfen laut EU Recht keine verkohlten Stellen aufweisen (VERORDNUNG (EG) Nr. 606/2009) und werden daher elektrisch erhitzt, nicht auf offener Flamme. Die unterschiedliche Erhitzungsart kann sich auf die Zusammensetzung der flüchtigen Rauchkomponenten auswirken. Das Verhältnis der Oberfläche von Holz zu Wein unterscheidet sich deutlich bei den unterschiedlichen Ausbaumethoden.

Während beim Barriquefass nur die Innenoberfläche mit dem Wein in Kontakt tritt, werden die Eichenholzchips vollständig vom Wein umgeben. Daher ist bei den Chips die komplette Oberfläche nutzbar, bei Barriques nur etwa 40% davon (Garde-Cerdán und Ancín-Azpilicueta 2006). Auch sind die Eichenholzstücke meist nicht dicker als ein bis zwei Millimeter, wohingegen der Wein beim Barriquefass tiefer eindringen kann, um Holzinhaltsstoffe herauszulösen. Durch das unterschiedliche Verhältnis von Holzoberfläche zu Wein können Konzentrationsunterschiede einzelner Verbindungen beobachtet werden.

Aufbauend auf diesen Ansatzpunkten werden in dieser Arbeit drei verschiedene Analysenmethoden entwickelt, um eine Unterscheidung von Weinen, die im Barriquefass gelagert wurden und Weinen, die mit Eichenholzstücken behandelt wurden, zu ermöglichen.

◆ **Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

Mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) werden die flüchtigen Holzinhaltsstoffe in den Weinen bestimmt. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf Furanderivaten, aromatischen Aldehyden, Lactonen und phenolischen Verbindungen.

◆ **Hochleistungsflüssigchromatographie mit Diode Array Detektion**

Um auch die nicht- bzw. schwerflüchtigen holzrelevanten Verbindungen zu erfassen, wird eine Methode mittels Hochleistungsflüssigchromatographie mit Diode Array Detektion (HPLC-DAD) entwickelt. Hierbei werden vor allem phenolische und polyphenolische Verbindungen erfasst.

◆ **^1H Kernresonanzspektroskopie**

Eine weitere Methode zur Untersuchung der nicht- bzw. schwerflüchtigen holzrelevanten Verbindungen wird auf der ^1H Kernresonanzspektroskopie (^1H NMR) aufgebaut. Mit dieser Methode werden ebenfalls phenolische und polyphenolische Verbindungen analysiert.

Da wie oben erwähnt keine Impactverbindung zu erwarten ist, werden die gemessenen Ergebnisse der drei etablierten Methoden mittels multivariater Statistik ausgewertet. Die daraus entstehenden Modelle aus authentischen Proben werden mit Hilfe von bekannten Testweinen verifiziert und validiert, und können zukünftig eingesetzt werden, um unbekannte Weinproben zu klassifizieren.

2 Kenntnisstand

2.1 Stand der Forschung

Die Analytik von Inhaltsstoffen aus dem Holz, die bei der Weinbereitung in den Wein übergehen, wird mit unterschiedlichen Methoden schon lange durchgeführt. Bei der Herstellung von Wein wird Eichenholz auf verschiedene Arten eingesetzt. Die klassischen Methoden sind vor allem große Eichenholzfässer von bis zu 1000 L Fassungsvermögen, Barriquefässer, der Einsatz von Eichenholzchips inahltanks oder auch die Verwendung von Staves. Hierbei handelt es sich um Eichenholzdauben, die in einen Stahltank eingebracht werden. Diese Weine wurden mit verschiedenen Aufarbeitungen und Analysensystemen sowohl auf flüchtige als auch auf nichtflüchtige Verbindungen untersucht. Fragestellungen waren unter Anderem, inwieweit die Herkunft des Holzes einen unterschiedlichen Einfluss auf den Wein hat (Waterhouse und Towey 1994; Fernández de Simón et al. 2003b; Jindra und Gallander 1987; Rodriguez-Bencomo et al. 2009; Cadahía et al. 2009). Auch wurde untersucht, wie sich die Art der Trocknung des Holzes auf die Inhaltsstoffe im Eichenholz auswirkt und ob dadurch auch mit Holz behandelte Weine beeinflusst werden (Cadahía et al. 2003; Wilkner und Gallander 1989). Weiterhin wurde untersucht, ob die Art der Toastung von Eichenholz einen unterschiedlichen Einfluss auf die Inhaltsstoffe im Wein hat (Chatonnet 1999; Bozalongo et al. 2007; Chatonnet et al. 1999; Fernández de Simón et al. 2010). Darüberhinaus wurden auch kombinierte Fragestellungen behandelt, beispielsweise wie sich die Herkunft des Holzes in Verbindung mit der Art der Trocknung bezüglich der Inhaltsstoffe verhält (Martínez et al. 2008; Spillman et al. 2004b).

Da bis vor ein paar Jahren der Einsatz von Eichenholzchips in der Weinbereitung in Europa verboten war und seit 2006 in eingeschränktem Maße in Deutschland erlaubt ist, haben einige Forschergruppen versucht, chemische Unterschiede in Weinen, die im Barriquefass gelagert wurden und solchen, die mit Eichenholzchips behandelt wurden, zu finden. Aufgrund der Tatsache, dass das gleiche Grundmaterial verwendet wird und dementsprechend keine Impactverbindung vorhanden ist, wurde versucht, über statistische Verfahren Intensitätsunterschiede verschiedener Inhaltsstoffe zu finden.

Eine der ersten Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet wurde von Arapitsas et al.

(2004) durchgeführt. Anhand der Analyse von flüchtigen Verbindungen in kommerziellen Barriqueweinen und selbst hergestellten Chipsweinen (die Eichenholzstücke wurden in zwei verschiedenen Größen verwendet) wurden unterschiedliche statistische Verfahren angewendet, um eine Trennung der beiden Gruppen zu erhalten. Zunächst wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass eine Trennung möglich ist. Mittels einer schrittweisen Diskriminanzanalyse war eine signifikante Unterscheidung möglich. Es konnten sowohl im erstellten Modell, als auch in der Kreuzvalidierung mehr als 90 % der Weine der richtigen Gruppe zugeordnet werden.

Eine Forschungsgruppe aus der Schweiz um Butticaz und Rawyler (2007) hat über die Analyse von flüchtigen Verbindungen mittels GC-MS versucht, Weine, die mit Eichenholzchips behandelt waren, von Barriqueweinen zu trennen. Die statistische Analyse ergab eine konkrete Trennung der beiden Gruppen. Es ist jedoch anzumerken, dass diese Untersuchung auf Modellweinen basierte.

Drei unterschiedliche Systeme des Weinausbaus mit Eichenholz verglich die Gruppe um Del Álamo et al. (2008). In dieser Studie wurde ein spanischer Rotwein zum einen in traditionellen Barriquefässern ausgebaut, zum anderen inahltanks mit Eichenholzchips oder mit Eichenholzstaves. Es wurden schwerflüchtige phenolische Inhaltsstoffe untersucht und zur Trennung der Gruppen wurden die Lineare Diskriminanzanalyse und die Hauptkomponentenanalyse verwendet. Die verschiedenen Systeme konnten statistisch getrennt werden. Es zeigte sich, dass mit der Zunahme der Lagerdauer des Weins in Flaschen die Unterschiede größer wurden.

Die Problematik liegt oft in der Auswahl der Proben, da es im Handel eine Vielzahl von Weinen unterschiedlichster Herkunft, Rebsorte und auch önologischer Behandlung gibt. Bei der Analytik der flüchtigen Verbindungen ist von Vorteil, dass die Farbe des Weines keine entscheidende Rolle spielt. Werden schwerflüchtige Substanzen untersucht, ist ein deutlicherer Unterschied in der Farbe des Weines zu erkennen, als zwischen mit Chips versetzten Weinen und Barriqueweinen. Mit der Analyse der schwerflüchtigen Verbindungen kann man auch den Einfluss von Sauerstoff auf den Wein erkennen, der oft beim Einsatz von Eichenholzchips nicht vorhanden ist. Daher ist eine Kombination verschiedener Techniken die bessere Alternative, vor allem, wenn ein breites Spektrum an Proben verwendet wird, um die sehr unterschiedlichen Herstellungsverfahren, Weinsorten oder auch Herkunftsländer in den Datenpool mit einzubeziehen.

2.2 Rechtsvorschriften

Eichenholzchips dürfen gemäß der VERORDNUNG (EG) Nr. 606/2009 in der Weinbereitung und im Weinausbau eingesetzt werden. Der Weinausbau schließt sowohl die Gärung frischer Trauben, als auch die Gärung von Traubenmost ein. Die verwendeten Holzstücke müssen ausschließlich von Quercus Arten abstammen. Erhitzte Eichenholzstücke dürfen keine Verbrennungsmerkmale aufweisen, nicht verkohlt sein und dürfen keiner weiteren Behandlung unterzogen werden, die die natürlich extrahierbaren Substanzen erhöhen würde. Die Größe der Stücke muss so bemessen sein, dass mindestens 95 % der Eichenholzchips in einem 2 mm Sieb zurückbleibt (VERORDNUNG (EG) Nr. 606/2009). Inländische Qualitätsweine b. A. und Prädikatsweine, die in Eichenholzfässern ausgebaut wurden, dürfen nur mit den Angaben im Barrique gegoren, im Barrique ausgebaut, im Barrique gereift oder mit einer anderen Angabe nach Anhang XVI in Verbindung mit Artikel 66 Absatz 2 Unterabsatz 1 Satz 1 und Unterabsatz 3 der VERORDNUNG (EG) Nr. 607/2009 versehen werden, wenn die Dauer der Reifung von 6 Monaten für Rotwein und 3 Monate für Weißwein im Holzbehältnis eingehalten wird, mindestens 75 % des Weines im Holzfass der angegebenen Art ausgebaut worden sind und das Fassungsvermögen des Fasses ein Volumen von 350 L nicht überschreitet. Wird ein Wein unter Einsatz von Eichenholzstücken hergestellt, darf dem Wein keine Prüfungsnummer für einen Prädikatswein zugeteilt werden (Weinverordnung 2009). Auch darf ein Wein, der unter Verwendung von Eichenholzchips bereitet wurde, nicht mit dem Ausdruck „im Eichenholzfass gereift“ oder ähnlichen Begriffen bezeichnet werden (VERORDNUNG (EG) Nr. 1507/2006).

2.3 Herstellung und Verwendung von Barriquefässern

Die Alterung in Eichenfässern ist eine traditionelle Methode in der Weinherstellung. Dies dient der Verbesserung des Aromas, der Farbstabilisierung und der Qualität des Weins (Bozalongo et al. 2007; Frangipane et al. 2007; Perez-Coello et al. 2000). Barriquefässer, deren Bezeichnung heute für ein kleines Weinfass aus Eichenholz steht, haben eine durchschnittliche Füllmenge von 225 L. Die Bezeichnung Barrique stammt aus dem Französischen. Während der Julirevolution 1830 wurden in Paris kleine Holzfässer mit Erde gefüllt als Schutz gegen die Angreifer aufgestapelt, also als Fundament für Barrikaden verwendet. Auch ist die Größe eines Barriquefasses aus praktischen Gesichtspunkten entstanden. Ein Fass dieser Größe kann in leerem Zustand von einem Mann allein transportiert

werden (Johnson 1989).

Für die Qualität eines Weines stellt die Herstellungsweise des Barriquefasses einen entscheidenden Faktor dar (Doussot et al. 2002). Zur Herstellung eines Barriquefasses werden fast ausschließlich Hölzer der Stieleiche (*Quercus robur*), der Traubeneiche (*Quercus petraea*) und der amerikanischen Weißeiche (*Quercus alba*) verwendet (Steidl und Leindl 2001; Viriot et al. 1993). Die verschiedenen Eichenarten lassen deutliche Unterschiede im Aromaprofil des Weines erkennen (Doussot et al. 2002; Fernández de Simón et al. 2003a).

Die Herstellung von Barriquefässern gestaltet sich aufwändig und ist zeit- und kostenintensiv. Der Eichenstamm wird zunächst auf Länge geschnitten und anschließend in Daubenbretter gespalten (im sogenannten Spiegelschnitt). Dabei ist zu beachten, dass die Daubenbretter so gewonnen werden, dass die Jahresringe rechtwinklig zur Weinseite stehen und die Markstrahlen parallel dazu liegen, damit der Wein nicht durch die Markstrahlen nach außen diffundiert (Steidl und Leindl 2001). Anschließend wird das Holz getrocknet. Bei der traditionellen Art der Trocknung werden die Dauben auf Stößen geschichtet und der Witterung ausgesetzt. Dies ist eine sehr aufwendige Methode. Es besteht auch die Möglichkeit der beschleunigten Trocknung, bei der das Holz bei konstanten Temperaturen in einem Ofen getrocknet wird. Dieser Vorgang ist nach etwa 28 Stunden abgeschlossen, jedoch ist das Ergebnis qualitativ nicht mit der traditionellen Methode zu vergleichen. Der Vorgang der traditionellen Trocknung dauert in der Regel zwei bis drei Jahre und ist beendet, wenn die Umgebung die gleiche Luftfeuchtigkeit besitzt wie die Dauben. Der Wassergehalt reduziert sich von anfänglich 40 - 60 % auf ca. 15 %. Während dieser Zeit durchläuft das Holz folgende Stufen: Dehydratisierung, Rehydratisierung und konstante Feuchtigkeit (Spillman et al. 2004b; Cadahía et al. 2001).

Während des Reifungsprozess können zahlreiche Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen die Holzinhaltsstoffe beeinflussen. Flüchtige Holzinhaltsstoffe wie zum Beispiel Lactone, phenolische Aldehyde oder flüchtige Phenole zeigen unterschiedliches Verhalten, manche Stoffe haben nach der Trocknung höhere Gehalte, andere hingegen reichern sich ab. Phenolische Aldehyde wie Vanillin, Syringaaldehyd, Sinapaldehyd oder Coniferaldehyd zeigen nach der Trocknung höhere Gehalte, wohingegen Eugenol und trans- β -Methyl- γ -octalactone sich je nach den äußeren Bedingungen der Trocknung unterschiedlich verhalten können. Höhere Konzentrationen an Ellagtanninen als bei im Ofen getrocknetem Holz wurden ebenfalls nachgewiesen. Technisch getrocknetes Holz enthält weniger

Vanillin und Eugenol, wohingegen traditionell getrocknetes Holz mehr Gesamtlactone enthält. Insgesamt werden durch die traditionelle Trocknung die Bitterkeit und die Adstringenz reduziert und die aromatischen Eigenschaften durch die Veränderung der chemischen Struktur verbessert. Einen weiteren Vorteil bietet die natürliche Trocknung, da durch diesen Prozess die Gefahr von Haarrissen verringert wird (Martínez et al. 2008).



Abbildung 2.1: Barriquefässer im Weinkeller

Die im Holz vorhandenen wasserlöslichen phenolischen Substanzen, wie z. B. die Ellagtannine, werden reduziert. Dies kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden, wie z. B. das Auslaugen der Dauben durch den Regen sowie hydrolytisch oxidative Degradation mit der Bildung von braunen Polymeren. Oligomere Ellagtannine werden nach ihrer Polymerisation unlöslich und die enzymatische Aktivität (Phenolheterosidase, Etherase und Depsidase), die ihren Ursprung in Pilzen hat, kann zur Zerstörung von phenolischen Strukturen wie z. B. Cumارين und hydrolysierbaren Tanninen führen (Cadahía et al. 2001).

Nachdem die Dauben zu einem halbgebundenen Fass zusammengesetzt sind, werden sie von außen befeuchtet und über ein offenes Feuer gestülpt. Nur durch diese Kombination aus Feuchtigkeit und Hitze wird das Holz formbar ohne zu brechen und die Dauben können mit einem Seilzug zum Fass gebogen werden. Durch diese Vorgehensweise wird die Spannung aus dem Holz genommen. Anschließend wird das oben und unten offene Fass wieder über das Eichenfeuer gestellt, um die Innenoberfläche auf eine ausreichende Temperatur zu erhitzen und eine signifikante Bräunung zu erreichen. Diese Behandlung kann zwischen 30 und 60 min dauern und es kommt dabei zu einer Bräunung (Toasting), welche leicht, mittel bis stark (light, medium, heavy) ausfallen kann (Steidl und Leindl 2001; Cadahía et al. 2001; Mosedale 1995; Matricardi und Waterhouse 1999). Im Weinkeller werden die Fässer je nach Platz in bis zu 5 Lagen gestapelt (siehe Abbildung 2.1).

2.4 Herstellung und Verwendung von Eichenholzchips

Auf dem Markt sind Eichenholzchips in verschiedenen Qualitäten, Größen, Toastungsgraden, Holzarten und Preisen erhältlich. Häufig werden die Reststücke an Eichenholz, die bei der Barriqueherstellung übrig bleiben, zur Eichenholzchipsherstellung verwendet. Das Holz wird zur Zerkleinerung geraspelt und anschließend nach Größe sortiert. Dabei ist zu beachten, dass die Größe der Eichenholzstücke so gewählt werden muss, dass mindestens 95% der Masse in einem 2 mm Sieb zurückgehalten werden (VERORDNUNG (EG) Nr. 606/2009). Die Eichenholzchips werden, im Gegensatz zu den Eichenholzfässern, nicht über dem offenen Feuer getoastet, sondern elektrisch bei etwa 150 - 250 °C in einem Apparat, der einem Kaffeeröster ähnlich ist, erhitzt. Diese Methode wird verwendet, um eine Verkohlung der Chips zu vermeiden, die rein rechtlich nicht zulässig ist (VERORDNUNG (EG) Nr. 606/2009). Je nach Temperatur beträgt die Toastungszeit zwischen 20 und 40 Minuten. Dabei entstehen Toastungsgrade, die von leicht getoastet über medium getoastet bis hin zu stark getoasteten Chips reichen (siehe Abbildung 2.2) (Bauer 2003).

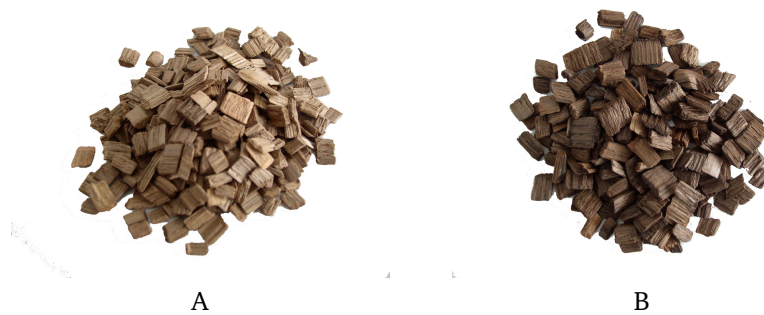


Abbildung 2.2: Abbildung A zeigt leicht getoastete Eichenholzchips, die Abbildung B zeigt stark getoastete Eichenholzchips

Die Verwendung von Eichenholzchips in der Weinbereitung ist eine Alternative zum Barriqueausbau. Sie ist nicht nur ökonomischer, sondern auch einfacher in der Handhabung als der Ausbau im Eichenholzfass und weniger zeitintensiv. Durch den Einsatz von Eichenholzchips in Weißweinen wird die Oxidation von Aromastoffen und Farbveränderungen vermieden. Mit kurzen Kontaktzeiten sind vergleichbare Ergebnisse wie mit dem Barriqueausbau erzielbar. Weine, die mit Eichenholzchips behandelt wurden, zeigten mehr Farbe. Eine bessere Extraktion von flüchtigen Verbindungen aus dem Holz ist ebenfalls zu beobachten (Guchu et al. 2006; Del Álamo Sanza und Domínguez 2006).

Der Einsatz von Eichenholzchips kann in verschiedenen Stadien der Weinbereitung erfolgen. Mittlerweile ist sogar die Vergärung mit Eichenholzchips erlaubt. Es werden Konzentrationen von 1 - 10 g/L Wein verwendet, je nach gewünschter Aromaintensität. Diese hängt auch von der Dauer des Einsatzes ab, der zwischen zwei und acht Wochen liegen kann.

2.5 Zusammensetzung von Eichenholz

Für das Aromaprofil eines Barriqueweins ist die Holzart, die Herkunft des Holzes, die Stärke der Toastung und die Kontaktzeit zwischen dem Eichenfass und dem Wein von entscheidender Bedeutung (Mosedale 1995; Guchu et al. 2006; Perez-Coello et al. 1997). Durch Kontakt mit getoastetem Holz werden durch den Wein Aromastoffe aus der Oberfläche des Barriquefasses sowie aus tieferen Holzschichten extrahiert. Einige dieser Stoffe liegen im unbehandelten Holz vor, ein Großteil wird jedoch erst während der Fassherstellung beim Toasten (Thermolyse von Lignin und Cellulose) oder der Reifung im Barriquefass (Oxidation) gebildet (Fernández de Simón et al. 2009; Cadahía et al. 2003; Amen-Chen et al. 2001;

González-Rodríguez et al. 2003).

Eichenholz besteht zu 40% aus Cellulose, 20% Hemicellulosen (hauptsächlich Xylane), 25% Ligninen und 10% Tanninen. Hinzu kommt noch die Fraktion der extrahierbaren Substanzen, die hauptsächlich aus polymerisierten Ellagtanninen, Ligninen und Lignan und Polysacchariden besteht. Die genaue Zusammensetzung fällt bei den verschiedenen Eichenarten unterschiedlich aus. (Nonier et al. 2005; Dinsmoor Webb 1974).

Cellulose besteht aus β -1,4-glycosidisch gebundenen Cellobioseeinheiten, die wiederum ein Disaccharid aus Glucosemolekülen darstellen und besitzt eine unverzweigte, lineare Struktur. Die Glucosemoleküle in der Cellulose liegen jeweils um 180° verdreht vor.

Hemicellulosen sind ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen Polysacchariden. Die Monomere, die darin vorkommen, sind vor allem Hexosen (zum Beispiel Glucose, Galactose, Mannose) und Pentosen (zum Beispiel Xylose, Arabinose). Allerdings ist die Hemicellulose im Gegensatz zur Cellulose weniger stabil und zerfällt bei der Erhitzung des Holzes in ihre einzelnen Bestandteile. Die einfachen Kohlenhydrate karamellisieren durch die Hitze und es entstehen typische Röstaromen. Der thermische Abbau von Hemicellulose verläuft exotherm (Cutzach et al. 1997, 1999; Ramiah 1970).

Lignin entsteht aus hauptsächlich drei Precursoralkoholen: *p*-Hydroxycinnamyl-Alkohol, der die Grundlage für die *p*-Hydroxyphenyleinheiten darstellt; 4-Hydroxy-3-methoxycinnamyl-(Coniferyl-) Alkohol, Grundlage für die Guaiacyl-Einheiten; und 3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamyl-(Sinapyl-) Alkohol, Grundlage für die Syringyl-Einheiten. Radikalische Copolymerisation dieser Alkohole führt zu einem heterogenen, optisch inaktiven, vernetzten Polymer. Lignin in Angiospermen enthält in etwa gleich viel Guaiacyl- bzw. Syringyl-Einheiten (Kirk und Farrell 1987).

Die Zusammensetzung der Makromoleküle des Holzes, wie Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Lipide, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen im getoasteten Holz und somit auf die sensorische Ausprägung des Weines (Fernández de Simón et al. 2009; González-Rodríguez et al. 2003).

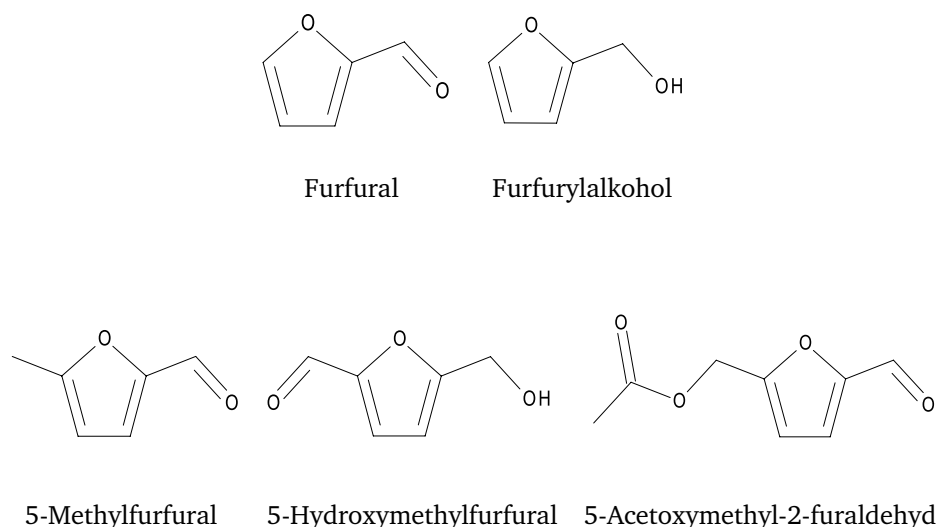


Abbildung 2.3: Flüchtige Holzaromastoffe mit Furangrundgerüst

2.6 Flüchtige Verbindungen

2.6.1 Furan Derivate

Bei der Toastung des Holzes werden Cellulose und Hemicellulose durch Thermodegradation zu Monosacchariden (Glucose, Arabinose, Mannose, Xylose) und kurzen Polysacchariden depolymerisiert. Die entsprechenden Zucker reagieren in Kombination mit einer Aminokomponente in einer Maillardreaktion zu Furanderivaten, wie z. B. Furfural oder Furfurylalkohol (siehe Abbildung 2.3). Außerdem können Furane bei einer Pentosen- oder Hexosen-Pyrolyse bei 180 °C entstehen. Diese können bei der partiellen Hydrolyse aus dem Holz extrahiert werden (Fernández de Simón et al. 2009; Cutzach et al. 1997; Mosedale und Puech 1998; Ortega-Heras et al. 2004; Steinbeiss et al. 2006). Das Aroma erinnert an getrocknete Früchte und gebrannte Mandeln (Garde-Cerdán und Ancín-Azpilicueta 2006).

2.6.2 Aromatische Aldehyde

Wird die Temperatur weiter erhöht, kommt es zum Zusammenbruch des Lignin-Cellulosesystems, bei welchem die Aryl-Ether Bindungen des Ligninpolymers gespalten werden. Es entstehen zunächst aromatische Aldehyde (Chatonnet 1999;

Nonier Bourden et al. 2008). Daraus werden vermehrt deren korrespondierende Säuren gebildet. Es entsteht beispielsweise Vanillin, das das Weinaroma direkt beeinflusst und dem Wein eine angenehme Vanillenote gibt. Auf dem gleichen Weg entsteht Syringaaldehyd, der im Aroma an Vanille erinnert (Steidl und Leindl 2001; Mosedale 1995; Mosedale und Puech 1998), siehe Abbildung 2.4.

2.6.3 Phenole

Bei Temperaturen von über 200°C tauchen verschiedene Pyrolyseprodukte wie Methoxy-(Guaiacyl-) bzw. Dimethoxy-(Syringyl-)Phenole auf, wie beispielsweise Guaiacol (o-Methoxyphenol), welches für den Rauchtton in Weinen verantwortlich ist. Beim Ausbrennen werden die Tannine abgebaut und es entstehen Saccharide und einfache Phenole wie z. B. Eugenol (Gewürznelken), 4-Methylguaiacol, 4-Ethylphenol (holzig, rauchig, würzig) und 4-Ethylguaiacol (siehe Abbildung 2.4). 4-Ethylphenol und 4-Ethylguaiacol können in höheren Konzentrationen zu Fehl-aromen wie z. B. Pferdeschweiß, Stall und Rauchfleisch führen (Steidl und Leindl 2001; Garde-Cerdán und Ancín-Azpilicueta 2006; Arapitsas et al. 2004).

2.6.4 Lactone

Lactone spielen bei der Eichenholzfassreifung eine wichtige Rolle. Besonders ist hier das β -Methyl- γ -octalacton zu nennen, welches oft auch als Whiskylacton oder Eichenlacton bezeichnet wird (siehe Abbildung 2.5). Es wurde zuerst von Suomalainen und Nykänen (Suomalainen und Nykänen 1970a, b) in Spirituosen, die in Eichenfässern gelagert waren, besonders aber in Bourbonwhisky gefunden. Insgesamt liegen vier verschiedene Stereoisomere des Whiskylactons vor (Guichard et al. 1995). Natürlich kommt jedoch nur das (4S,5S)- β -Methyl- γ -octalacton vor (im Folgenden als *cis*-Whiskylacton bezeichnet) (Mosedale und Puech 1998). Ein zweites Isomer - (4S,5R)- β -Methyl- γ -octalacton (im Folgenden als *trans*-Whisky-lacton bezeichnet) - entsteht während der Fassherstellung. Die Konzentration von *cis*-Whiskylacton in Eichenholz ist um das 4 - 13fache höher als von *trans*-Whiskylacton, je nach Herkunft und Art des Holzes (Pollnitz et al. 1999; Hayasaka et al. 2007). Die Höhe der Konzentration an Whiskylactonen und das Verhältnis der beiden Isomere lassen auf die Sorte und die geographische Herkunft des verwendeten Holzes schließen (Fernández de Simón et al. 2003a; Mosedale und Puech 1998). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Wahrnehmungsschwelle für das natürlich vorkommende *trans*-Whiskylacton in etwa 7 mal höher

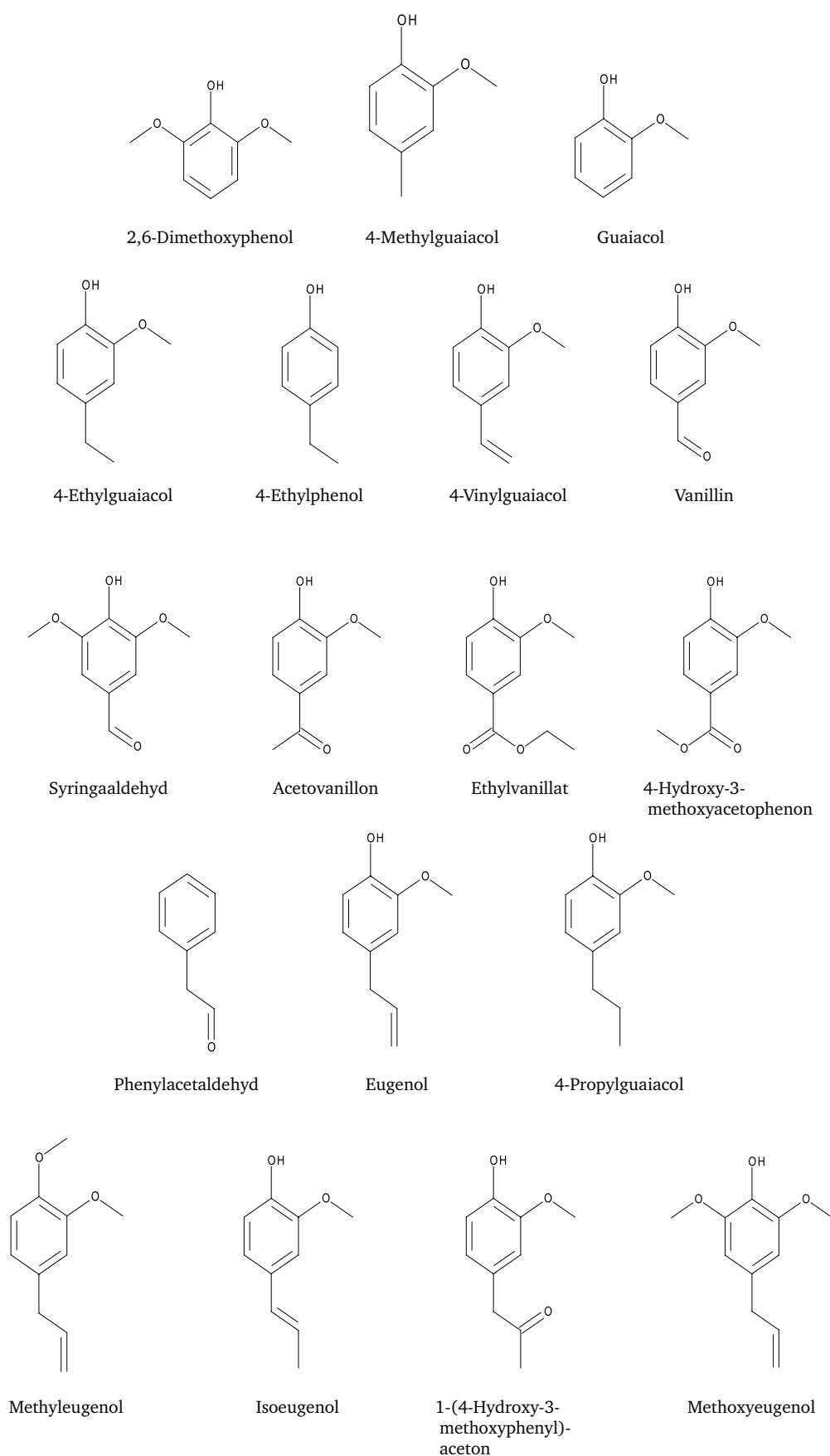


Abbildung 2.4: Flüchtige Holzaromastoffe mit Phenolgrundgerüst

lag als die für das natürliche *cis*-Whiskylacton (Brown et al. 2006). Studien haben gezeigt, dass amerikanische Eiche einen höheren Gehalt an *cis*-Whiskylacton enthält als französische Eiche und dass bei der amerikanischen Fassherstellung, verglichen mit der französischen, mehr *cis*-Whiskylacton im Verhältnis zum *trans*-Whiskylacton entsteht (Spillman et al. 2004b; Waterhouse und Towey 1994; Maga 1989).

Man nimmt an, dass die Isomere durch die thermische Degradation von Eichenlipiden entstehen. Ein anderer bekannter Mechanismus ist die Dehydrierung von 2-Methyl-3-(3,4-dihydroxy-5-methoxybenzo)-octansäure, die im Eichenholz vorkommt. Besonders bei mittlerer und starker Toastung entstehen die Whiskylactone, die dem Wein den typischen Eichenton, der an Kokos erinnert, verleihen (Steidl und Leindl 2001; Mosedale 1995; Cadahía et al. 2003; Lee und Noble 2003; Ortega-Heras et al. 2007), wobei das *cis*-Whiskylacton eine größere Bedeutung bezüglich der Aromaintensität hat (Spillman et al. 2004a). Außerdem kommen in Weinen mit Holzkontakt auch γ - und δ -Decalactone und γ - und δ -Nonalactone vor (Guchu et al. 2006; Díaz-Maroto et al. 2008).

Der Ursprung der Whiskylactone ist noch nicht vollständig geklärt. Es sind jedoch beide Isomere im grünen Eichenholz vorhanden. Die Konzentration im Holz kann sich aber erhöhen, beispielsweise während der Lagerung des Holzes, der Fassherstellung, in Eichenholzextrakten in Modellwein, der auf 50°C erhitzt wurde und sogar im Injektorblock eines Gaschromatographen während der Analyse von Eichenholzextrakten (Wilkinson et al. 2004; Pollnitz et al. 1999).

Die beiden Verbindungen Ring-opened *cis*-Whiskylacton glucoside und Ring-opened *cis*-Whiskylacton galloylglucoside wurden aus dem Holz von *P. strobilacea*, einer Walnußart (*Juglandaceae*), von Tanaka und Kuono (1996) extrahiert. Das

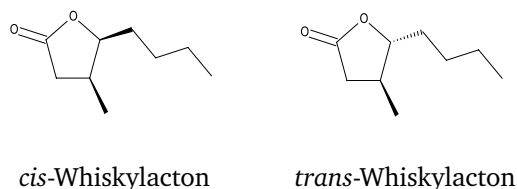


Abbildung 2.5: Die beiden wichtigsten Lactone (4*S*,5*S*)- β -Methyl- γ -octalacton (*cis*-Whiskylacton) und (4*S*,5*R*)- β -Methyl- γ -octalacton (*trans*-Whiskylacton)

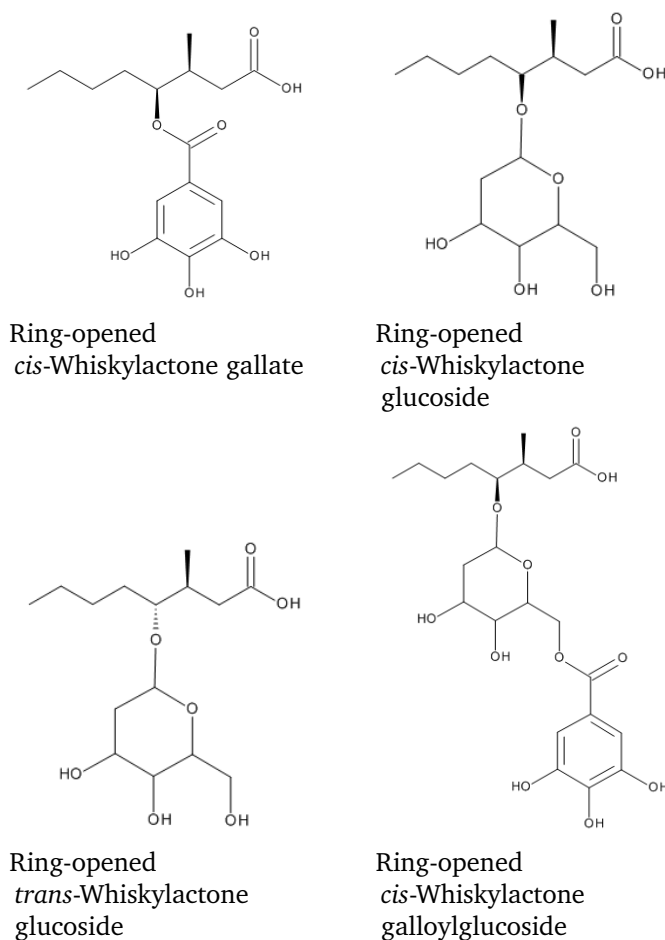


Abbildung 2.6: Precursoren der Whiskylactone

Galloylglucosid wurde anschließend auch im Eichenholz gefunden (Masson et al. 2000). In stark saurem Milieu führt die Hydrolyse der beiden Verbindungen zu dem erwarteten (4*S*, 5*S*) *cis*-Whiskylacton (Wilkinson et al. 2004). Die vier in Abbildung 2.6 gezeigten Verbindungen konnten mittels eines LC-MS/MS Verfahrens in Eichenholzextrakten aus amerikanischer und französischer Eiche nachgewiesen werden (Hayasaka et al. 2007).

2.7 Schwerflüchtige Verbindungen

Das Holz von *Quercus* Arten enthält große Mengen an Polyphenolen, die sich hauptsächlich aus hydrolysierbaren Tanninen, in geringerem Anteil aus wasserunlöslichen Tanninen, den sogenannten Proanthocyanidinen (kondensierte Tanni-

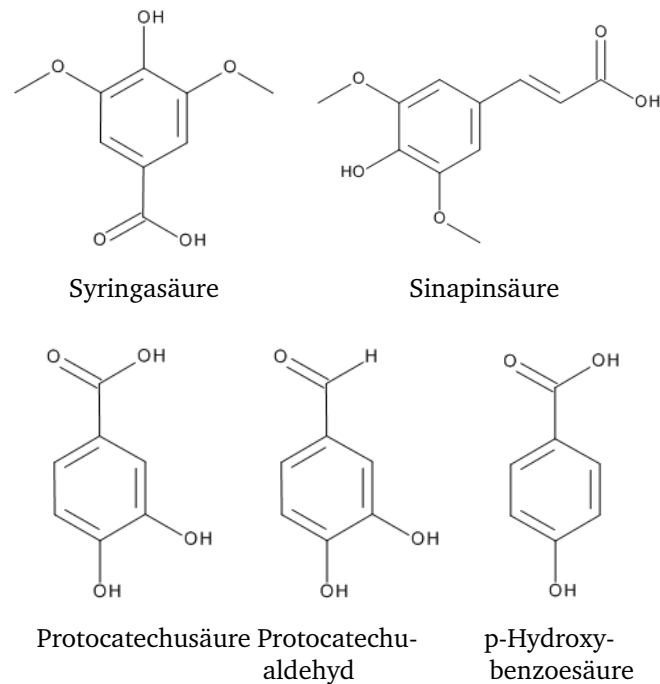


Abbildung 2.7: Schwerflüchtige Holzaromastoffe mit Phenolgrundgerüst

ne) und verschiedenen Derivaten der Hydroxyzimtsäure (hauptsächlich p-Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure) zusammensetzen (siehe Abbildung 2.7).

Die Tannine sind für die Stabilität des Holzes und die Resistenz des Holzes gegen Pilz- oder Bakterienbefall verantwortlich (Scalbert et al. 1988; Vivas et al. 1995, 2004). Diese Verbindungen tragen direkt oder indirekt zur Farbe, zur Adstringenz und zum Aroma bei und sind an Bräunungsreaktionen im Wein oder den Trauben beteiligt (Ho et al. 1999). Durch ihre Fähigkeit, große Mengen an Sauerstoff bei den Oxidationsreaktionen aufzunehmen, spielen Ellagtannine eine wichtige Rolle als Antioxidantien (Cadahía et al. 2009). Durch die natürliche Mikrooxygenierung im Barriquefass werden Polymerisations- bzw. Kondensationsreaktionen zwischen den Flavonoidkomponenten (Tannin-Tannin und Tannin-Anthocyanidin) begünstigt (Nonier Bourden et al. 2008; Ortega-Heras et al. 2007). Tannine definieren sich als lose Gruppe von wasserlöslichen Pflanzenpolyphenolen, die sich dadurch hervorheben, dass sie Proteine binden können. Diese Funktion ist die Grundlage für ihre biologische Aktivität und ihre besonderen Eigenschaften, wie zum Beispiel die Adstringenz. Vor allem Polyphenolmoleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 500 D zeigen diese biologische Aktivität, allerdings sind Moleküle mit mehr als 300 D schlecht wasserlöslich.

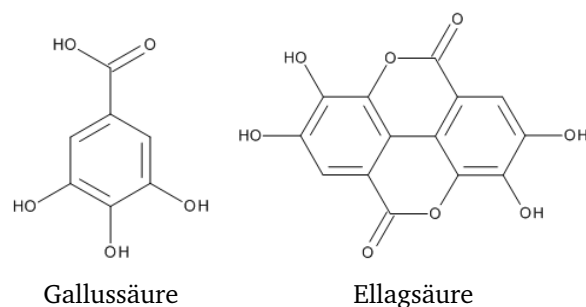


Abbildung 2.8: Die Grundbausteine der hydrolysierbaren Tannine - Gallussäure und Ellagsäure

2.7.1 Hydrolisierbare Tannine

Die wasserlöslichen Tannine enthalten einen Zucker (meist D-Glucose) als Grundeinheit, von der die Hydroxy-Gruppen mit Gallussäure oder Ellagsäure (siehe Abbildung 2.8) verestert sind (Hagerman und Butler 1991). Diese Tannine lassen sich leicht enzymatisch oder im sauren bzw. basischen Milieu in freie Gallussäure bzw. Ellagsäure hydrolisieren (Waterhouse 2002). Dabei können diese Tannine eingeteilt werden in Gallotannine (Bisgalloylester) bzw. Ellagtannine (Hexahydroxydiphenylester), je nachdem, welche Säure in der Struktur gebunden ist. In der Trockenmasse von Eichenholz kommen Ellagtannine zu bis zu 10 % vor (Scalbert et al. 1988). Die zwei bekanntesten Ellagtannine sind Vescalagin und Castalagin (Mayer et al. 1967). Weitere sechs wasserlösliche Ellagtannine (Roburin A-D) (Hervé du Penhoat et al. 1991b, a) leiten sich von Vescalagin oder Castalagin ab und sind entweder Dimere oder entstehen durch Addition eines Pentoserests.

Die hydrolisierbaren Tannine im Wein stammen fast ausschließlich aus dem Holz, wobei sie dort sowohl in der Rinde als auch im Kernholz von Quercus Arten vorkommen (Puech et al. 1999).

2.7.2 Kondensierte Tannine

Kondensierte Tannine liegen als Oligomere oder Polymere vor. Diese sind aus C6-C3-C6 Flavanoleinheiten, die über Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen verknüpft sind, aufgebaut (Haslam 2007; Vidal et al. 2004). Diese Bindungen sind weniger hydrolyseanfällig als die hydrolysierbaren Tannine (Hagerman und Butler 1991). Durch die Erhitzung des Holzes können diese Verbindungen gelöst werden und die

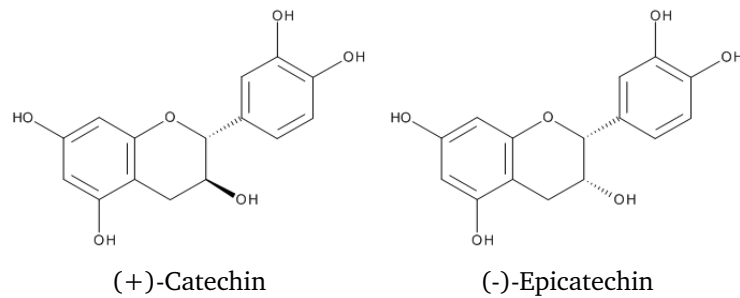


Abbildung 2.9: Die beiden bekanntesten Vertreter der Grundbausteine von kondensierten Tanninen - (+)-Catechin und (-)-Epicatechin

daraus resultierenden Spaltprodukte sind leichter wasserlöslich als die polymeren Strukturen. Die bekanntesten Vertreter der Grundbausteine sind (-)-Epicatechin und (+)-Catechin (siehe Abbildung 2.9), die beide auf einem Flavan-3-ol Gerüst aufbauen. Durch Kondensationsreaktionen der Einzelbausteine entstehen Proanthocyanidine mit Polymerisationsgraden von zwei bis 50 und auch größer.

Die kondensierten Tannine in Wein kommen nicht nur aus dem Holz, sie können auch aus anderen Quellen stammen. So finden sich in Rotwein und roten Trauben im Vergleich zum Eichenholz recht hohe Gehalte an kondensierten Tanninen (Puech et al. 1999).

2.8 Analytik

2.8.1 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) ist in analytischen Labors zur Probenextraktion und zur Probenaufreinigung weit verbreitet (Ferreira et al. 2004b). Dabei handelt es sich um eine Kartusche, die mit einem Sorbens gefüllt ist (ähnlich der Säulenchromatographie, nur in kleinerem Maßstab), welches je nach zu isolierendem Molekül gewählt werden kann.

Auf dem Markt findet sich eine Vielzahl an Sorbentien, so dass diese Methode vielseitig anwendbar ist und sowohl für flüchtige als auch für nichtflüchtige Weininhaltsstoffe verwendet werden kann. Durch die Kombination mit unterschiedlichen Lösemitteln ist eine individuelle Extraktion bezogen auf die Fragestellung möglich. Die Vorteile sind die Robustheit, die Möglichkeit der Automation, selektive

Isolierung von Stoffen und auch Fraktionierung von Substanzgemischen. Die SPE stellt eine gute Aufkonzentrierungstechnik dar, die auch routinetauglich ist. Auch wurden für verschiedene Verbindungen in Wein SPE Methoden publiziert (Ferreira et al. 2004b; Campo et al. 2007; López et al. 2002; Ferreira et al. 2004a).

2.8.2 Gas Chromatographie - Massenspektrometrie

Der Aromaeindruck von Lebensmitteln entsteht hauptsächlich über die flüchtigen Inhaltsstoffe. Diese werden zusammen mit den Geschmackseindrücken der Zunge zum Gesamtbild des Aromas. Daher eignet sich die Gaschromatographie zur Analyse dieser Substanzen im Wein sehr gut. Am weitesten verbreitet ist die Kapillargaschromatographie, bei der eine mit Polyamid beschichtete Quarzglassäule verwendet wird. Die Detektion kann über viele verschiedene Arten erfolgen. Die Kopplung mit einem Massenspektrometer liefert auch bei komplexen Mischungen flüchtiger Komponenten sehr gute Ergebnisse, da diese über eine Spektrenbibliothek einzelnen Substanzen zugeordnet werden können. Zur Detektion können verschiedene Arten von Massenspektrometern verwendet werden. Der Vorteil von einem Ionenfallen Massenspektrometer ist eine Selektion und Anreicherung von spezifischen Massenfragmenten in der Falle. Somit können einzelne Massenfragmente im „Selected Ion Monitoring“ gezielt analysiert werden (Hübschmann 1996).

2.8.3 HPLC

Die Hochleistungsflüssig-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) stellt eine Analysenmethode zur Untersuchung von schwerflüchtigen bis nicht flüchtigen Substanzen dar. In einem Wein sind viele phenolische und polyphenolische Verbindungen enthalten, die schwerflüchtig sind und eine Rolle bei der Reifung von Wein spielen. Die Detektion der einzelnen Stoffe kann über eine Vielfalt von Detektoren erfolgen. Vorteilhaft bei einem Diodenarraydetektor (DAD) ist die Erfassung eines weiten Wellenlängenbereichs. Es können also verschiedene Wellenlängen gleichzeitig gemessen werden und somit die einzelnen Verbindungen anhand ihres spezifischen Spektrums identifiziert werden (Meyer 2009).

2.8.4 NMR Spektroskopie

Die ersten NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Signale wurden 1945 von Bloch (1946) und Purcell et al. (1946) nachgewiesen. Seitdem ist die Bedeutung der NMR Spektroskopie ständig gewachsen. Heute wird diese Analytik in so unterschiedlichen Fachgebieten wie der Biologie, der Medizin, der Geologie oder der Materialwissenschaften genutzt. Der wichtigste Bereich ist aber die Chemie. Dort wurde sie zu Beginn hauptsächlich zur Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen genutzt. Es entstehen aber immer neue Möglichkeiten, bei denen die NMR Spektroskopie angewendet werden kann, wie zum Beispiel quantitative Auswertungen, Kopplungen mit chromatographischen Systemen oder auch die Verwendung von Vielstoffgemischspektren zur Mustererkennung. Gerade auf dem Gebiet der Lebensmittelanalyse hat die NMR Spektroskopie einen hohen Stellenwert, da sie zerstörungsfrei und selektiv ist und sich eignet, eine Vielzahl an niedermolekularen Komponenten in komplexen Gemischen gleichzeitig zu detektieren (Košir und Kidrič 2002).

Einen weiteren Vorteil stellen der geringe Aufarbeitungsaufwand und die kurze Zeitspanne für Experimente dar (Gil et al. 2003). In den letzten Jahren wurde die NMR Spektroskopie vermehrt auf die direkte Analyse von flüssigen Lebensmitteln angewendet, beispielsweise auf Olivenöl (Sacchi et al. 1997; Mannina et al. 2001), Fruchtsäfte (Le Gall et al. 2001; Belton et al. 1997), Bier (Duarte et al. 2002) und Wein (Košir und Kidrič 2002). Es hat sich gezeigt, dass sich die ^1H NMR Spektroskopie sehr gut als eine schnelle Screening Methode eignet und effizient zur Prüfung der Authentizität von Getränken genutzt werden kann (Cuny et al. 2008; Brescia et al. 2002; Fragaki et al. 2005; Belton et al. 1996).

2.8.5 Aufbau eines NMR Spektrometers

Da die meisten NMR Experimente ein homogenes magnetisches Feld benötigen, ist der wichtigste Bestandteil eines NMR Spektrometers der Magnet. Meistens wird hierbei ein supraleitender Magnet verwendet, da dieser ein extrem stabiles und starkes Magnetfeld erzeugt. Damit supraleitende Stoffe große magnetische Felder ohne elektrischen Widerstand von außen erzeugen können und zum Erreichen der kritischen Temperatur dienen können, müssen diese auf den Siedepunkt von flüssigem Helium gekühlt werden (4 K).

Das Herzstück eines NMR Spektrometers besteht aus einer Magnetspule aus einer Legierung aus Niob und Zinn, die in flüssigem Helium lagert. Das Heliumbad ist nach außen hin abgeschirmt durch ein Reservoir gefüllt mit flüssigem Stickstoff, mit einer Temperatur von 77 K. Beide Tanks sind voneinander und vom Umfeld durch evakuierte Wände getrennt, um Temperaturlecks zu vermeiden. Die Größe eines NMR Spektrometers ist durch die Kühlflüssigkeitstanks gegeben (Levitt 2001).

2.8.6 NMR-Lösungsmittelunterdrückung

Da ein Wein möglichst ohne Aufarbeitung untersucht werden soll, besteht die Schwierigkeit darin, dass in der Probe erhebliche Mengen an Wasser und Ethanol vorhanden sind. Das Verhältnis der zu untersuchenden Substanzprotonen im Gegensatz zu den Protonen der Lösungsmittel ist sehr gering. Ohne eine Unterdrückung der Signale, die diese Lösungsmittel hervorrufen, würde das Spektrum unbrauchbar. Um die Signale im Bereich der Wasser- bzw. Alkoholpeaks noch statistisch auswerten zu können, müssen diese Peaks sehr selektiv unterdrückt werden (Hore 1989).

Die Methoden, die hierfür verwendet werden können, lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Bei der ersten Kategorie handelt es sich um Verfahren, bei denen das Lösungsmittelsignal vor der Akquisition unterdrückt wird. Innerhalb dieser Gruppe kann weiter unterschieden werden, ob die Magnetisierung der Lösungsmittelprotonen verändert wird oder unverändert bleibt. In der zweiten Kategorie wird die Unterdrückung erst nach der Aufnahme der Spektren durchgeführt.

Die ideale Methode zur Lösungsmittelunterdrückung würde exakt nur das Lösungsmittel unterdrücken und alle anderen Signale unverändert lassen. Außerdem müsste die Methode einfach in der Anwendung sein und sollte keine zu hohen Anforderungen an das System stellen. Es sind aber in der Praxis eine Vielzahl von Fragestellungen interessant, so dass eine einzelne Methode nicht für jede Problematik einsetzbar ist. Es ist für jeden einzelnen Fall zu überdenken, welche Methode angewendet werden kann (Guéron et al. 1991).

Vor der eigentlichen Spektrenaufnahme können die Methoden der Presaturation, auch Vorsättigung genannt, der Unterdrückung mittels Relaxation und der Unterdrückung durch gepulste Feldgradienten durchgeführt werden. Nach der Spektrenaufnahme kann durch Manipulation der Aquisition eine Unterdrückung erreicht werden.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Vorsättigung (Presaturation) verwendet, welches die bekannteste, einfachste und effektivste Methode ein Lösungsmittelsignal zu unterdrücken darstellt (Hoult 1976).

Die Tatsache, dass die Protonen des Wassers eine längere Relaxationszeit haben als die Protonen in organischen Verbindungen, wird bei der Presaturation ausgenutzt. Es wird vor der Datenaufnahme über den Entkoppler (Decoupler) mit der Resonanzfrequenz des Lösungsmittels auf die Probe eingestrahlt. Dies funktioniert jedoch nur, wenn es sich um einen selektiven Impuls handelt, der mit exakt der Lösungsmittelfrequenz eingestrahlt wird. Ist der Impuls zu stark, ist die Selektivität nicht mehr gegeben. Somit sind die Lösungsmittelprotonen schon gesättigt. Das heißt, dass diese Protonen von nachfolgenden Impulsen nicht mehr angeregt werden und somit im Spektrum nur noch als kleine Signale erkennbar sind. Gleichzeitig werden die Substanzprotonen über einen kurzen Rechteckimpuls angeregt. Somit sind im Spektrum die Peaks der Substanzprotonen besser zu erkennen und werden nicht mehr von den sehr großen Lösungsmittelsignalen überdeckt (Herzog und Messerschmidt 1995).

Wie lange und wie stark der Entkopplerpuls sein muss, ist manuell durch Versuche zu optimieren.

Ein Problem der Presaturation ist die Intensitätsverminderung von Signalen, die in der Nähe der Lösungsmittelpeaks sitzen. Signale, die direkt neben den unterdrückten Peaks liegen, können nicht quantitativ ausgewertet werden. Da sich das Wassersignal bei 4,7 ppm befindet, die phenolischen Verbindungen, welche für die Fragestellungen in dieser Arbeit wichtig sind, aber in einem Bereich von etwa 5-10 ppm liegen, ist der Bereich um das Lösungsmittelsignal zu vernachlässigen.

2.8.7 NOE Differenzspektren

Bei dem Nuclear-Overhauser-Effect (Kern-Overhauser-Effekt), der von Overhauser (1953) postuliert wurde, geht man davon aus, dass eine Sättigung eines Kernspins durch ein Entkopplerfeld eine Verstärkung der NMR Signale von benachbarten Kernen hervorrufen kann (Blümich 2005). Diese Theorie wurde ursprünglich für die wechselseitige Beeinflussung der magnetischen Momente von Kernen und Elektronen entwickelt. Es geht in den Experimenten um die Änderung von Signalintensitäten. Weitergeführt wurde die Theorie von Anet und Bourn (1965) und Carver und Slichter (1953). NOE wird, im Gegensatz zur Spin-Kopplung, nicht über direkte Bindungen, sondern über den Raum beobachtet. Es handelt sich um Intensitätsänderungen von Resonanzlinien im Zusammenhang mit Doppelreso-

nanz Experimenten, wobei im Einzelnen unterschiedliche Mechanismen wirksam sind. Dabei ist eine Intensitätszunahme des Kernresonanzsignals für ein System aus einem Kernspin und einem Elektronenspin zu beobachten, wenn zugleich die Elektronenresonanz mit einem Hochfrequenzfeld der Frequenz ν_s gesättigt wird (Günther 1983). Also ist eine relative Intensitätsänderung eines Signals durch die selektive Sättigung eines anderen Spins erreichbar. Der NOE Effekt lässt sich sowohl in heteronuklearen als auch in homonuklearen Systemen beobachten. Es ist zu beachten, dass dieser Effekt nur messbar ist, wenn der Abstand der Protonen voneinander sehr klein ist. Er sollte nicht größer als 3 Å sein, am besten sogar kleiner als 2,5 Å. In der ^1H NMR Spektroskopie ist dieser Effekt für die Strukturaufklärung nützlich (Friebolin 2006).

2.8.8 Bucketierung von NMR Spektren

Bei den meisten analytischen Verfahren werden von den untersuchten Proben Konzentrationen bestimmter Stoffe gemessen und quantifiziert. Bei einem ^1H NMR Spektrum von Wein werden jedoch eine große Zahl von zum Teil überlappenden Resonanzsignalen erfasst, die schlecht quantifizierbar sind.

Um aber Unterschiede in den spektroskopischen NMR Datensätzen zunächst der authentischen Proben zu erkennen und zu erfassen, ist die Anwendung leistungsstarker Bucketierungstechniken, die jeden Datensatz als Ganzes betrachten, sehr erfolgversprechend.

Dafür wird das gemessene Spektrum in einzelne Teile zerlegt, sogenannte *Buckets*, und die Fläche unter dem Spektrum in einem solchen *Bucket* wird zur statistischen Analyse herangezogen (Stoyanova et al. 2004; Albano et al. 1978). Der Vorteil der Bucketierung ist, dass keine konkreten Konzentrationen weiter statistisch verarbeitet werden, sondern einfache Zahlenwerte verwendet werden.

Die Größe der *Buckets* kann variiert werden, auch ist es möglich, nur bestimmte Teile eines Spektrums dafür zu verwenden. So ist es zum Beispiel bei der NMR Analytik von Wein sinnvoll, sich auf den phenolischen Bereich zwischen 5 und 10 ppm zu konzentrieren, oder auch die Bereiche auszulassen, in die die Lösungsmittelsignale fallen.

Werden Spektren von bekannten Proben einer Bucketierung unterzogen und anschließend statistisch ausgewertet, ist es möglich, die Gewichtung einzelner Abschnitte im Spektrum sichtbar zu machen. Es wird erkennbar, welche Bereiche im

Spektrum diskriminierend sind und welche kaum Information enthalten.

Wie in Abbildung 2.10 zu sehen ist, haben die einzelnen Buckets auf der rechten Seite unterschiedliche Flächen. Je größer die Fläche ausfällt, desto mehr Einfluß hat dieser Bereich des Spektrums auf die statistische Auswertung. Im Beispiel der Zuordnung von Weinen zur Gruppe Chips oder Barrique wären die Abschnitte mit den größten Flächen auch die Bereiche, die die meiste Information zur Trennung der beiden Gruppen enthalten. Somit kann man im Einzelfall solche Abschnitte ausschließen, die wenig Informationsgehalt besitzen und die Bereiche feiner unterteilen, die einen hohen Informationsgehalt aufweisen. In diesem Fall wären die Abschnitte zwischen 8 und 10 ppm auszuschließen, da in diesem Bereich wenig Information enthalten ist. Das Augenmerk wäre auf den Bereich zwischen 6 und 8 ppm zu legen, da in diesem Fall hier die meiste Information enthalten ist. So lässt sich ein individuelles Modell für jede entsprechende Fragestellung erstellen.

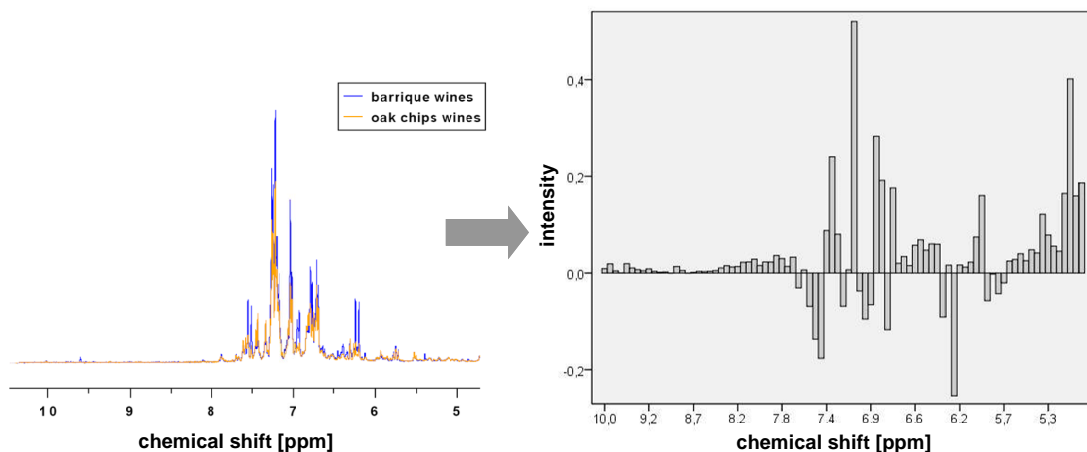


Abbildung 2.10: Ein Spektrenausschnitt aus der ^1H NMR Messung eines mit Chips versetzten Weines und eines Barrique Weines mit der dazu gehörenden Bucketierung mit Gewichtungsprofil der einzelnen Buckets.

2.9 Statistik

Die multivariate statistische Datenanalyse wird immer häufiger in der chemischen Analytik eingesetzt. Unter dem Überbegriff Chemometrie wird die Anwendung mathematischer und statistischer Methoden von chemischen Analysenergebnissen zusammengefasst. Dies dient unter anderem der Planung von Experimenten, der Extraktion von Informationen aus den Messdaten und zur Klassifizierung von Proben (Moret et al. 1994).

Die multivariate Datenanalyse in der Lebensmittelbranche wird in vielen Teilgebieten eingesetzt. Zu nennen sind die Bewertung der Qualität von Lebensmitteln und die Typisierung und Charakterisierung von Früchten, Fruchtsäften, fermentierten Getränken und Spirituosen (Mangas et al. 1997). Außerdem wird die multivariate Statistik bei der Auswertung von sensorischen Analysen von Lebensmitteln angewandt (Guchu et al. 2006).

Auch zur Klassifizierung von Weinen wird die multivariate Datenanalyse häufig eingesetzt, wobei mehrere Klassen von chemischen Variablen und sensorischen Merkmalen verwendet und mit verschiedenen statistischen Methoden ausgewertet werden können (Moret et al. 1994). Die dabei eingesetzten Methoden sind unter anderem die Hauptkomponentenanalyse, die lineare Diskriminanzanalyse oder auch die Technik der Partial Least Squares Regression (Mangas et al. 1997; García-Jares und Médina 1993; Seeber et al. 1991).

2.9.1 Pattern Recognition

Die Idee, eine Mustererkennung (Pattern Recognition - PR) in den Naturwissenschaften zur Auswertung von Analysen zu verwenden, entstand schon in den 1960er Jahren, vor allem auf der Grundlage der damals neuen digitalen Computer (El-Deredy 1997; Lindon et al. 2001). Diese Methode ist vor allem in der analytischen Chemie weit verbreitet, da hierbei oft eine Vielzahl an Analyten untersucht wird. PR wird als eine Methode beschrieben, um Muster in Lerndatensätzen zu finden und daraus Klassifizierungsregeln zu erstellen, die zur Zuordnung von unbekannten Proben herangezogen werden können.

Aufbauend auf einem Datensatz, bestehend aus authentischen Objekten und deren gemessenen Variablen, der in vorgegebene Klassen eingeteilt ist, versucht man Regeln zu erstellen, die es möglich machen, neue Objekte als gleich oder ungleich zu den Lernobjekten der vorgegebenen Klassen zuzuordnen. Dabei ist es möglich,

quantifizierte Daten mit einer realen Konzentration zu verwenden. In diesem Fall spricht man von einer *targeted Analyse*.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, eine Mustererkennung mit ganzen Spektren oder Chromatogrammen oder Teilen davon durchzuführen, ohne einzelne Inhaltsstoffe zu kennen. Diese Art von Fingerprinting wird als *nontargeted Analyse* bezeichnet (Defernez und Colquhoun 2003; Krishnan et al. 2005). Die Mustererkennung kann sowohl *supervised* (mit bekannter Gruppenzugehörigkeit) als auch *unsupervised* (ohne Gruppenzugehörigkeit) angewendet werden (Hollywood et al. 2006). Bekannte Pattern Recognition Methoden stellen die Hauptkomponentenanalyse, die Lineare Diskriminanzanalyse oder auch die Lineare Regression dar.

2.9.2 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse, auch bekannt als Principal Component Analysis (kurz PCA), ist ein mathematisches Verfahren, bei dem eine Datenmatrix in ein neues, vereinfachtes Koordinatensystem überführt werden kann. Pearson (1901) hat die Methode der Hauptkomponentenanalyse zunächst nur unter geometrischen Gesichtspunkten beschrieben. Verbesserungen wurden u. a. von Hotelling (1933) vorgenommen und später, vor allem auf dem Gebiet der Chemometrie, durch Wold et al. (1983).

Die Hauptkomponentenanalyse wird auch als Eigenvektor Analyse bezeichnet und ist mit der Faktorenanalyse verwandt. Ist zunächst noch nicht klar, welche Schlüsse aus den Ergebnissen gezogen werden können, also eine Datenmatrix zur Verfügung steht, die zunächst nicht in Gruppen unterteilt ist, ist ein *unsupervised*-Verfahren zu verwenden (Holmes et al. 2000; Cloarec et al. 2005b; Kowalski und Bender 1972). Die Hauptkomponentenanalyse ist ein solches Verfahren und daher der erste Schritt, um einen Überblick über die Zusammenhänge von Objekten und Variablen zu bekommen. Ein PCA Modell gibt einen Überblick über alle Objekte bzw. Variablen. Es werden beispielsweise Gruppierungen, Trends, Ausreißer und Extremwerte erkennbar (Trygg et al. 2007).

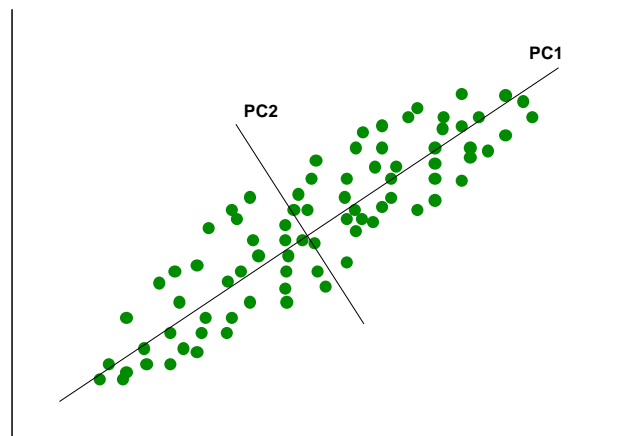


Abbildung 2.11: Modell einer Principal Component Analysis. Die erste PC liegt entlang der größten Varianz der Datenpunkte. Die zweite PC liegt orthogonal auf der ersten.

Es handelt sich hierbei um eine Projektionsmethode, deren Ziel es ist, systematische Variationen zu identifizieren, das heißt eine möglichst kompakte Darstellung der Varianz einer Datenmatrix zu geben. Es wird eine Varianzmaximierung angestrebt (Pearson 1901; Jackson 1991). Bei der PCA wird im Hyperraum der Variablen die Gerade gesucht, die die meiste Information enthält, dadurch wird die Dimensionalität des Systems reduziert (Seeber et al. 1991). Geht man von einer Matrix X aus, die K Spalten (Variablen) besitzt und N Zeilen (Objekte), so kann diese Matrix als eine Punktwolke aus N Punkten im K -dimensionalen Raum dargestellt werden (Wold et al. 1987). Man kann sich die Hauptkomponenten (Principal Components = PCs) als Geraden durch diese Punktwolke vorstellen (siehe Abbildung 2.11). Sie sind Linearkombinationen der Datenvariablen (Daszykowki et al. 2007). Hierbei wird PC 1 so durch die Wolke gelegt, dass die Abstände der Punkte zur Geraden möglichst gering sind. Das heißt, dass mit dieser Geraden ein möglichst großer Teil der Varianz der Messdaten erklärt wird. Die zweite PC liegt orthogonal zur ersten und wiederum wird versucht, die Abstände der Punkte zur zweiten Geraden zu minimieren. Ebenso wird mit allen weiteren PCs verfahren. Jede einzelne PC beschreibt einen Teil der Varianz, der von den vorherigen PCs noch nicht erklärt wurde. Da die einzelnen PCs orthogonal zueinander stehen, sind sie voneinander unabhängig und werden auch als latente Variablen bezeichnet (Daszykowki et al. 2007). Prinzipiell sind $N-1$ Hauptkomponenten

möglich, sofern mehr Variablen als Objekte in der Ursprungsmatrix vorhanden sind. Sind mehr Objekte als Variablen vorhanden, sind K Hauptkomponenten möglich. Allerdings werden meist mit weniger als 10 Hauptkomponenten mehr als 95% der vorhandenen Varianz erklärt (Pearson 1901; Massart und Kaufman 1983; Daszykowski et al. 2003). Anhand der Hauptkomponentenanalyse werden die originalen Daten in eine neue Matrix aus sogenannten Scores, \mathbf{T} und eine Matrix aus sogenannten Loadings, \mathbf{P} zerlegt:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T \quad (2.1)$$

Man versucht mit dieser Methode, den Punkteschwarm im K -dimensionalen Raum auf einen Unterraum mit einer niedrigeren Dimension zu projizieren. Die Abbildung der Matrix \mathbf{X} auf einen A -dimensionalen Unterraum durch die Projektionsmatrix \mathbf{P}' gibt dem Objekt in dieser Ebene (\mathbf{T}) Koordinaten (siehe Gleichung 2.1). Dabei werden die Spalten in \mathbf{T} , t_a , Score Vectors und die Zeilen in \mathbf{P}' , p'_a , Loading Vectors genannt. Die Vektoren t_a und p_a sind orthogonal zueinander. Die Abweichung zwischen den Projektionen und den originalen Koordinaten werden *Residuen* genannt (Daszykowski et al. 2007).

Diese neuen Variablen sind auf die originalen Variablen gewichtet. In einem Scores Plot werden die Objekte (in diesem Fall die gemessenen Weine) als einzelne Punkte dargestellt, meist in einem zwei- bis dreidimensionalen Raum, wobei die Achsen des Koordinatensystems den einzelnen PCs entsprechen. Die Gewichtungssprofile der Variablen werden Loadings genannt. Der Einfluss (das Gewicht) für jede Score Variable wird, bezogen auf die original Variable, ersichtlich, wenn man die korrespondierenden Loadings Profile betrachtet. Die Loadings beziehen sich dabei auf die einzelnen Variablen (in diesem Fall die gemessenen Komponenten). Sie stellen den Winkelcosinus der Richtung der Geraden, die am besten passt, dar. Die Scores beziehen sich auf die einzelnen Objekte und stellen die Projektion der Probenpunkte entlang der Hauptkomponentenrichtungen dar. Dieser Zusammenhang ist wichtig, da er eine direkte Verknüpfung zwischen den Scores und den original Variablen darstellt (Wold et al. 1987; Lindon et al. 2003). Außerdem können aus den Loadingsplots diejenigen Variablen extrahiert werden, die im Hinblick auf die Trends bzw. Diskriminierung im Scoresplot das größte Gewicht (*Weight*) auf sich vereinigen.

Problematisch ist bei der PCA, die sich auf die Varianzanalyse stützt, die hohe Sensitivität auf äußere Einflussgrößen, die nicht mit den untersuchten Trends korreliert sind. Hierzu zählen beispielsweise die Messungenauigkeit, Abweichungen bei der Aufarbeitung oder auch eine Artefaktbildung. Diese Abweichungen werden häufig erst anhand von einem Scoreplot einer PCA erkennbar (Lay et al. 2006). Der Score Plot wird genutzt, um einen ersten Überblick über den Datensatz zu gewinnen. Außerdem ist die PCA Teil von vielen anderen chemometrischen Verfahren, wie zum Beispiel der multivariaten Regression und der Diskriminanzanalyse.

Hervorzuheben ist, dass bei der PCA auch Datenmatrizen ausgewertet werden können, die mehr Variablen als Objekte enthalten. Dies ist häufig der Fall bei Analysen in der Chemie, besonders bei spektroskopischen Messungen (Daszykowi et al. 2007).

Aufgrund dieser hohen Sensitivität der PCA auf Störfaktoren kommen für konkrete Fragestellungen, insbesondere für Zwei-Klassenfragestellungen, weitere chemometrische Methoden zum Einsatz, wie zum Beispiel die *Partial Least Squares*-Analyse (PLS) oder Variationen davon, die PLS-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) (Stahle und Wold 1987) oder auch die orthogonale PLS-DA (OPLS-DA) (Trygg und Wold 2002).

2.9.3 Lineare Diskriminanzanalyse

Die lineare Diskriminanzanalyse ist eine multivariate statistische Methode zur Klassifizierung von Gruppen. Aufbauend auf einem Lerndatensatz, bei dem die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Objekte bekannt ist, können unbekannte Daten diesen Gruppen zugeordnet werden. Diese Methode entspricht einem *supervised*-Verfahren, da die bekannten Objekte vor der Analyse einer Gruppe zugeordnet werden. Diese Objekte werden genutzt, um eine Regel zu finden, die die Objekte klassifiziert. Anschließend kann diese Regel genutzt werden, um unbekannte Proben zu klassifizieren (Kowalski und Bender 1972; García-Parrilla et al. 1997).

Die ersten Schritte auf diesem Gebiet wurden in den 1930er Jahren von R. A. Fisher gemacht. Durch spezielle lineare Funktionen über die durchgeführten Messdaten von verschiedenen Irisarten konnte eine Klassifizierung der Population erreicht werden (Fisher 1936).

2.9.4 Partial Least Squares Analyse

Entstanden ist der PLS (*projections to latent structures by means of partial least squares*) Ansatz in den 1960er Jahren durch Hermann Wold. Er entwickelte einen einfachen aber effizienten Weg um Parameter in den sogenannten NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least Squares) Modellen abzuschätzen. Dies führte zum Acronym PLS (Partial Least Squares) für diese Art von Modellen. Diese Bezeichnung steht für den zentralen Teil dieser Abschätzung, dass jeder Modellparameter iterativ als die Kurve einfacher bivariater Regressionen (least squares) zwischen einer Matrix Spalte und einer Reihe als die y-Variable und einem anderen Parameter Vektor als die x-Variable abgeschätzt werden kann (Eriksson et al. 2001).

Die Partial Least Squares Analyse ist eine Methode, die Verknüpfungen zwischen zwei Datensätzen von Einflussvariablen und Antwortvariablen feststellt, eine generelle Methode zur Pfadanalyse über latente Variablen (Stahle und Wold 1987). Es handelt sich um eine Korrelationsanalyse, die die Werte einer Variable aus einem Set von kontrollierbaren unabhängigen Variablen abschätzt (Arvanitoyannis et al. 1999).

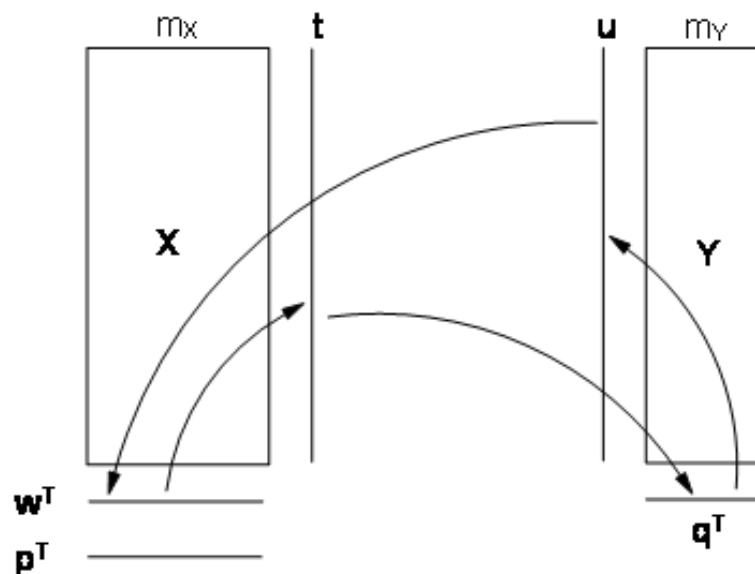


Abbildung 2.12: PLS Methode: X wird durch seine Scores t und Y durch u dargestellt. Eine erste Abschätzung von u erhält man durch die Multiplikation mit X um eine Abschätzung der *weights* von w^T zu erhalten. Die *weights* sind normalisiert zur Länge 1 und zurück multipliziert durch X um t zu erhalten. Die *weights* von q^T erhält man aus t und Y . Dies ergibt wiederum den neuen Vektor u . Die Prozedur wird bis zur Konvergenz von t wiederholt (Nach Westerhuis et al. (1998)).

Man kann die PLS als eine Regressionserweiterung der PCA auffassen. Da bei dieser Analyse die Lerndaten mit Gruppencodes versehen werden, handelt es sich hierbei auch um ein *supervised*-Verfahren.

Mittels PLS Verfahren ist es möglich, zwei unterschiedliche Variablenblocks (\mathbf{X} und \mathbf{Y}) in Relation zu bringen. In Abbildung 2.12 ist eine Schemazeichnung abgebildet, die die Theorie der PLS Analyse zeigt. Dabei enthält die \mathbf{Y} Matrix die abhängigen Variablen (in diesem Fall die Gruppenzugehörigkeit), die sogenannten Antworten (Responses), und die \mathbf{X} Matrix die korrespondierenden unabhängigen Variablen (in diesem Fall die Matrix aus den gemessenen Proben mit den entsprechenden Konzentrationen), die sogenannten Deskriptoren (Descriptors), wobei die beiden Datenmatrizen durch ihre Scores \mathbf{u} und \mathbf{t} repräsentiert werden. Die korrespondierenden Gewichtungen (*weights*) \mathbf{q} und \mathbf{w} erhält man mittels der Multiplikation der Scores durch die entsprechende Matrix. Die Gewichtung \mathbf{w} wird auf die Länge 1 normalisiert und neue Scores werden so aus den Gewichtungen erhalten. Das Ganze wird bis zur Konvergenz von \mathbf{t} wiederholt (Esbensen 2009; Westerhuis et al. 1998). In der analytischen Chemie wird PLS hauptsächlich zur multivariaten Kalibrierung eingesetzt. Beispielsweise enthält die Matrix \mathbf{X} N Spektren, mit K digitalisierten Wellenlängen, und \mathbf{Y} enthält die Konzentrationen von N Trainingset Proben. Das daraus entstandene Modell kann genutzt werden, um die Konzentrationen von den Spektren unbekannter Proben zu klassifizieren (Eriksson et al. 2001).

2.9.5 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)

Bei einer PCA Analyse werden die einzelnen PCs in der Richtung im multivariaten Raum gesucht, die die größte Varianz aufweist. Wird eine einfache PCA in einem PR Problem angewendet mit einem Datensatz, der einer oder mehreren Klassen zugeordnet werden kann, wird diese Gruppenzugehörigkeit nicht genutzt, um die Lage der PCs zu finden. Das Problem hierbei ist, dass die Richtung der maximalen Varianz nicht zwangsweise mit der Richtung der größtmöglichen Trennung zusammen liegt (Stahle und Wold 1987; Eriksson et al. 2001). Ist in einem Datensatz eine auffallende Struktur vorhanden, die jedoch nichts mit der Fragestellung gemeinsam hat, ist die PCA ein unzuverlässiges Werkzeug, da die PCs genau diese offensichtlichen Strukturen darstellen. In diesem Fall ist eine *supervised*-Technik von Vorteil, da ein Lerndatensatz mit vorgegebenen Klassen die offensichtlichen Strukturen in diesem Fall außer acht lässt. Auch besteht die Gefahr, dass man mit einem *unsupervised*-Verfahren möglicherweise PCs streicht, die hoch

mit den eigentlichen Zielvektoren korrelieren (Constantinou et al. 2005; Cloarec et al. 2005a).

In diesem Fall wird eine PLS Technik interessant, die sogenannte PLS Diskriminanzanalyse (PLS-DA). Die PLS-DA macht es möglich, eine Rotation der der Projektion von vorgegebenen latenten Variablen durchzuführen, die sich auf Klassentrennung (Diskriminierung) konzentriert. Da sich diese Analyse auf die Trennung von Gruppen bezieht, entspricht diese Methode einem *supervised*-Verfahren. Wie bei der PLS werden zwei Variablenblocks (**X** und **Y**) miteinander in Relation gebracht. Hierbei besteht der **X**-Block wieder aus den unabhängigen Variablen, der **Y**-Block hingegen bei der PLS-DA nicht aus den abhängigen Variablen, sondern aus einer *dummy*-Matrix, die mit diskreten Deskriptoren (0, 1) die Klassenzugehörigkeit der Proben angibt. Diese *dummy*-Matrix enthält so viele Spalten wie Klassen vorhanden sind. Anhand von *Score* und *Weight* Plots ist es möglich, die Korrelationsstruktur der Objekte und der **X** und **Y** Matrix zu erkennen (Eriksson et al. 2001; Wold und Sjöström 1998).

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit präsentiert. Zunächst werden die GC-MS Analysen vorgestellt, da diese am Beginn der Arbeit standen, gefolgt von den HPLC Ergebnissen und zum Schluss werden die Auswertungen der NMR-Analysen behandelt. Das Ziel der Arbeit war es, Methoden zu entwickeln, um Weine, die mit Eichenholzstücken behandelt wurden von Weinen, die im Barrique gelagert wurden, voneinander zu unterscheiden. Hierfür wurden zunächst authentische Weine (bei denen die komplette Herstellung überwacht wurde) untersucht und die einzelnen Modelle mit Proben aus der Region und unbekannten Handelsproben überprüft. Die vorhandenen authentischen Weine aus der Bayerischen Landesanstalt für Wein und Gartenbau (LWG) wurden mit allen drei Methoden untersucht.

Mit allen drei Methoden konnte eine Trennung von Weinen, die im Barrique gelagert wurden und Weinen, die mit Eichenholzchips behandelt wurden, erzielt werden. Die Kombination der einzelnen Methoden gibt die Möglichkeit, echte Ausreißer zu identifizieren und auch Mischproben, die sowohl im Barrique gelagert wurden als auch gleichzeitig mit Eichenholzchips behandelt wurden, zu erkennen.

3.1 GC-MS Analytik

Das übergeordnete Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob Weine, die im Barriquefass gelagert wurden, von Weinen zu unterscheiden sind, die mit Eichenholzchips behandelt wurden. Es wurden jedoch außerhalb dieser Fragestellung einige Versuchsreihen mit Barrique- bzw. Chipsweinen durchgeführt, um weitere Erkenntnisse über die flüchtigen Stoffe zu erhalten, die während einer Lagerung aus dem Holz in den Wein übergehen. Im Folgenden wird zunächst die Fragestellung zur Authentizität der Weine behandelt, anschließend werden die Einzelversuche aufgeführt, mit der jeweiligen Fragestellung und einer kurzen Einleitung.

3.1.1 Quantifizierung

Aufbauend auf der Diplomarbeit von Eißner (2006) wurde diese GC-MS Methode weiterentwickelt und auf die gegebene Fragestellung angepasst. Die Matrix

Wein stellt aufgrund des Alkoholgehaltes ein Problem bei der Aufarbeitung der Proben dar. Eine zufriedenstellende Methode war hierbei die Probenaufarbeitung mittels SPE (siehe Kapitel 4.1.9). Die Aufarbeitung der Proben und die nachfolgenden Auswertungsschritte sind schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Trotz

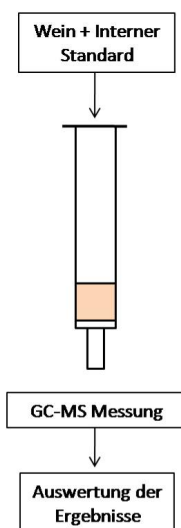


Abbildung 3.1: Fließdiagramm zur Aufarbeitung der Proben für die flüchtigen Holzinhaltsstoffe mittels SPE.

der großen Zahl an Einzelkomponenten (siehe Tabelle 4.2) konnten die GC-MS Bedingungen so gewählt werden, dass alle Substanzen in einem Lauf gemessen werden konnten. Die Messungen mittels GC-MS wurden quantitativ bezüglich der ausgewählten Substanzen durchgeführt. Für die externe Kalibrierung der einzelnen Substanzen wurden zusätzlich zur Überprüfung der Aufarbeitung drei unterschiedliche interne Standards verwendet. Es wurden die Substanzen 2-Octanol, ϵ -Decalacton und Methylcinnamat eingesetzt. Die Auswahl fiel auf diese Stoffe, da diese den zu untersuchenden Verbindungen ähneln, aber nicht natürlich im Wein vorkommen, mittels der SPE Methode gut isoliert werden können, nicht mit anderen, zu isolierenden Stoffen im Chromatogramm überlagern und drei unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen.

In Abbildung 3.2 ist beispielhaft ein Ausschnitt aus einem Chromatogramm eines Weißweins mit Eichenholzchips dargestellt. Die einzelnen Referenzsubstanzen wurden in einem neutralen Weißwein ohne Holzkontakt angesetzt, um eventuelle Matrixeffekte zu berücksichtigen. Der verwendete Weißwein wurde vor der Kalibrierung mittels der SPE Methode (siehe Kapitel 4.1.9) aufgearbeitet und gemessen, um eventuell natürlich vorhandene Konzentrationen der Referenzsubstanzen als Blindwert abzuziehen. Anschließend wurde jedes Kalibrierlevel

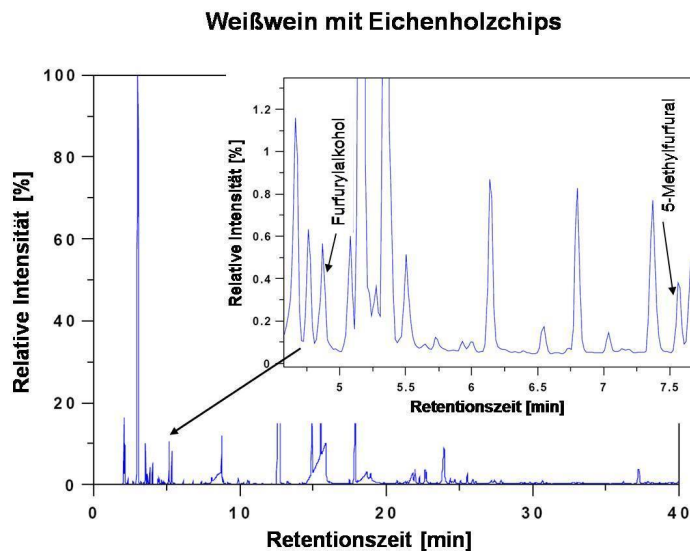


Abbildung 3.2: GC-MS Chromatogramm eines Weißweins mit Eichenholzchips. Die Identifizierung und Quantifizierung wurde über die Retentionszeit und die spezifischen Massenfragmente der einzelnen Komponenten durchgeführt. Beispielhaft sind die beiden Furan Derivate Furfurylalkohol und 5-Methylfurfural hervorgehoben.

dreifach aufgearbeitet und mit GC-MS gemessen.

Aus diesen Ergebnissen wurde mit der am Gerät vorhandenen Software für jede Verbindung eine Kalibrierkurve mit Geradengleichung erstellt. Auf die gleiche Weise wurden anschließend die einzelnen Proben aufgearbeitet und die holzrelevanten Inhaltsstoffe mit GC-MS analysiert. Die Identifizierung der einzelnen Substanzen wurde anhand der spezifischen Massenfragmente und der jeweiligen Retentionszeit durchgeführt.

In Tabelle 3.1 sind die Konzentrationsbereiche in $\mu\text{g/L}$ der zur Kalibrierung verwendeten Substanzen und die Anzahl der Kalibrierpunkte, die zur Erstellung der Geradengleichung verwendet wurden, angegeben. Die aufgeführten Konzentrationsbereiche wurden sowohl anhand von Erfahrungswerten als auch mit bereits in der Literatur dargestellten Ergebnissen festgelegt (Cutzach et al. 1997; Glabasnia und Hofmann 2007; Perez-Coello et al. 1999). Alle Komponenten zeigten sehr gute Korrelationswerte von $> 0,9$.

Substanz	Bereich $\mu\text{g/L}$	Anzahl Kalibrierpunkte	Steigung	Achsen-Abschnitt	Korrelation R^2
Furfural	23 - 2256	8	0.2031	0.0366	0.9938
Furfurylalkohol	45 - 2260	7	0.0259	-0.0056	0.9984
5-Methylfurfural	28 - 2844	8	0.5691	0.0975	0.9968
Guaiacol	1.4 - 136	8	0.7873	0.0195	0.9908
4-Ethylphenol	7.8 - 1568	9	1.6180	0.0306	0.9997
4-Methylguaiacol	0.8 - 166	9	1.1339	0.0182	0.9976
5-Hydroxymethylfurfural	73 - 3672	7	0.0180	-0.0156	0.9949
4-Ethylguaiacol	2.9 - 583	9	1.1706	0.0218	0.9989
cis-Whiskylacton	15 - 3078	9	0.1864	0.0885	0.9872
5-Acetoxymethyl-2-Furaldehyd	1.2 - 232	9	0.7289	-0.0100	0.9985
trans-Whiskylacton	14 - 2730	9	0.1425	0.0563	0.9914
2,6-Dimethoxyphenol	5.2 - 518	8	0.6247	-0.0350	0.9987
Eugenol	6.8 - 1352	9	0.4994	-0.0137	0.9993
Vanillin	27 - 1361	7	1.6994	-0.2101	0.9988
Isoeugenol	4.4 - 872	9	1.3442	-0.0302	0.9983
Acetovanillon	4.4 - 222	7	2.4214	-0.1102	0.9961
δ -Decalacton	4.4 - 872	9	0.9919	-0.0028	0.9985
Ethylvanillat	4.5 - 907	9	3.2182	-0.1626	0.9984
2,6-Dimethoxy-4-(2-Propenyl)-Phenol	1.6 - 312	9	1.3500	-0.1012	0.9964
Syringaaldehyd	25 - 2472	8	1.8250	-0.6709	0.9979

Tabelle 3.1: Kalibrierbereich GC-MS in $\mu\text{g/L}$

Die exakten Konzentrationen der einzelnen Kalibrierlevel sind im Experimentalteil unter dem Kapitel 4.1.13 aufgeführt. Außerdem wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Substanzen ermittelt und in regelmäßigen Abständen die Kalibrierung über Wiederfindungsmessungen überprüft. Die einzelnen Werte hierzu sind ebenfalls im Experimentalteil im Kapitel 4.1.13 zu finden.

3.1.2 Modellbildung mit authentischen Proben

In Europa ist gesetzlich festgelegt, welche önologischen Behandlungsmethoden für die Herstellung von Weinen zugelassen sind. Um den Verbraucher vor Täuschung zu schützen, ist es wichtig, analytische Methoden zu entwickeln, um die Herstellungsverfahren zu überprüfen. Da eine Unterscheidung von Weinen, die im Barrique gereift wurden und Weinen, die mit Eichenholzchips behandelt wurden, nicht mittels einer einzelnen Substanz möglich ist, sind statistische Auswertungs-

verfahren nötig. Um eine Unterscheidung dieser Proben durchzuführen, ist es essentiell, ein robustes statistisches Modell aus authentischen Weinproben zu bilden. Mit diesem Modell besteht dann die Möglichkeit, unbekannte Weinproben zu klassifizieren. Daher wurden Weine aus verschiedenen Versuchsanstalten, von lokalen Winzern und aus dem Handel (siehe Tabelle A.1 im Anhang), mittels GC-MS Analytik für die Modellbildung untersucht. Diese Weine waren hierbei in die drei Klassen authentisch, B-authentisch und unbekannt unterteilt. Die authentischen Proben kamen von Versuchsanstalten, bei denen die komplette Herstellung bekannt ist. Die B-authentischen Proben sind von Winzern der Region, bei denen nicht der ganze Herstellungsprozess überwacht wurde, aber eine Rückverfolgbarkeit gewährleistet ist. Die unbekannten Proben sind entweder laut Kennzeichnung mit Holz in Kontakt gewesen, oder eine sensorische Holznote war erkennbar.

Diese Weine wurden alle jeweils doppelt mittels SPE aufgearbeitet (siehe Kapitel 4.1.9) und anschließend mit GC-MS (siehe Kapitel 4.1.5, 4.1.7 und 4.1.13) gemessen.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in die Bildung des statistischen Modells eingegangen. Damit ein statistisches Modell zur Klassifizierung von unbekannten Proben herangezogen werden kann, wäre es im Idealfall nötig, alle Weine, die existieren, zu messen, um alle Eventualitäten mit einzubeziehen. Da dies realistisch nicht machbar ist, ist es wichtig, eine möglichst große Stichprobe aus der Grundgesamtheit zu verwenden. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit darauf geachtet, möglichst viele unterschiedliche Proben zu berücksichtigen, damit ein repräsentativer Querschnitt der Grundgesamtheit vorliegt. So sind unterschiedliche Jahrgänge, Rebsorten, Lagen, Weiß- und Rotweine in die Probenauswahl eingegangen. Außerdem wurden verschiedene önologische Behandlungen wie zum Beispiel Erst-, Zweit- und Drittbelegungen von Barriquefässern, unterschiedliche Holzherkünfte, Barriquehersteller, Chipshersteller, Chipsgrößen und die Lagerdauer bei den verschiedenen Verfahren in die Auswahl mit einbezogen. Dies ist wichtig, um möglichst viele Einflüsse auf den Wein zu untersuchen.

Die Problematik hierbei besteht in der Probeninhomogenität, die sich in relativ großen Schwankungen innerhalb der Messungen zeigt, also die Standardabweichungen dieser Messungen relativ hoch sind (siehe Tabelle 3.2). Man kann jedoch in diesem Fall die authentischen Proben, die Extremwerte aufweisen, nicht als Ausreißer aussortieren, da diese Weine auch zur Grundgesamtheit beitragen und berücksichtigt werden müssen. Um eine Minimierung der Standardabweichung zu

erreichen, ist es wichtig, die Stichprobe aus der Grundgesamtheit kontinuierlich zu erweitern.

Eine Normalverteilung der einzelnen Variablen über alle Proben ist durch die Schwankungen der Messungen nicht immer gegeben. Bei der multivariaten statistischen Auswertung werden aber häufig die abgeleiteten Variablen (Linearkombinationen) betrachtet, welche aufgrund des zentralen Grenzwertsatzes dem Normalverteilungsmodell besser entsprechen als die ursprünglichen Variablen. Dies ist vor allem bei Klassifizierungsanalysen von Vorteil (Flury und Riedwyl 1983).

Vor der Analyse wurden die Daten transformiert, um größere Varianzunterschiede auszugleichen. Hierfür wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben zentriert, das heißt der Mittelwert (μ) der Stichprobe einer Variable wird von jedem einzelnen gemessenen Wert (X) abgezogen. Anschließend wird jeder einzelne zentrierte Wert standardisiert. Dafür werden die erhaltenen Werte durch die Standardabweichung (σ) der Stichprobe geteilt (siehe Gleichung 3.1). Durch dieses Verfahren der Standardisierung haben alle Werte eine Standardabweichung von 1 (Bro und Smilde 2003; van den Berg et al. 2006).

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma} \quad (3.1)$$

Tabelle 3.2 zeigt die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der gemessenen Substanzen in Barrique und Chips Weinen. Die Werte lassen auf den ersten Blick vermuten, dass die Konzentrationen einiger Substanzen in den beiden Klassen Chips Weine und Barrique Weine große Unterschiede aufweisen. Wenn man sich jedoch die Standardabweichung der Verbindungen dazu vor Augen führt, sind die Unterschiede nicht signifikant.

Beispielsweise liegt der Mittelwert von Furfural in den Chips Weinen bei 683 $\mu\text{g/L}$ und bei den Barrique Weinen bei 2876 $\mu\text{g/L}$. Betrachtet man allerdings die Standardabweichung, so ist diese genauso hoch, oder sogar höher als der Mittelwert. Dies liegt vor allem daran, dass versucht wurde, eine möglichst große Stichprobe aus der Grundgesamtheit zu ziehen, um somit möglichst viele önologische Verfah-

ren und Weine miteinzubeziehen. Zur Verdeutlichung sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen von einigen der flüchtigen Verbindungen graphisch in Abbildung 3.3 dargestellt. In der logarithmischen Auftragung wird ersichtlich, dass sich die Mittelwerte zwar unterscheiden, allerdings die Standardabweichungen sich meist überschneiden. Eine monovariante Unterscheidung ist also nicht signifikant möglich, weshalb eine multivariate statistische Auswertung durchzuführen ist. Die Gehalte der Verbindungen, die in Tabelle 4.2 aufgeführt sind, wurden bei der multivariaten statistischen Analyse zur Modellbildung berücksichtigt. Die statistischen Auswertungen wurden mit einer Variablenzahl von 20 flüchtigen Komponenten durchgeführt.

Da bei allen eingesetzten Proben mit Holzkontakt das gleiche Grundmaterial (Eichenholz) verwendet wurde, sind auch die gleichen holzrelevanten flüchtigen Verbindungen messbar. Diese kommen zwar in unterschiedlichen Konzentrationen vor, aber die Zusammensetzung der Verbindungen unterscheidet sich nicht. Daher ist eine Trennung der verschiedenen Gruppen anhand der absoluten Konzen-

Substanz	Chips Weine			Barrique Weine		
	Mittelwert in $\mu\text{g/L}$	Median in $\mu\text{g/L}$	Standard- abweichung	Mittelwert in $\mu\text{g/L}$	Median in $\mu\text{g/L}$	Standard- abweichung
Furfural	683	317	668	2876	544	3499
Furfurylalkohol	449	163	615	2535	333	4964
5-Methylfurfural	39	43	57	277	59	326
4-Ethylphenol	41	7	170	47	5	179
Guaiacol	4	2	1	7	2	13
4-Methylguaiacol	2	3	4	7	2	27
5-Hydroxymethyl- furfural	79	12	169	128	7	345
4-Ethylguaiacol	162	9	27	634	187	789
cis-Whiskylacton	32	24	26	33	25	29
5-Acetoxymethyl- 2-Furaldehyd	2	5	3	4	4	4
trans-Whiskylacton	18	23	23	19	3	35
2,6-Dimethoxyphenol	68	35	215	53	22	24
Eugenol	28	18	21	87	28	113
Vanillin	164	17	232	9	2	165
Isoeugenol	99	108	123	112	70	124
Acetovanillon	32	16	29	18	9	18
δ -Decalacton	21	37	25	30	28	25
Ethylvanillat	189	46	195	155	72	163
2,6-Dimethoxy-4- (2-propenyl)-phenol	3	15	16	12	9	8
Syringaaldehyd	98	224	116	467	185	494

Tabelle 3.2: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen in $\mu\text{g/L}$ der authentischen Weine aufgeteilt in Chips Weine und Barrique Weine.

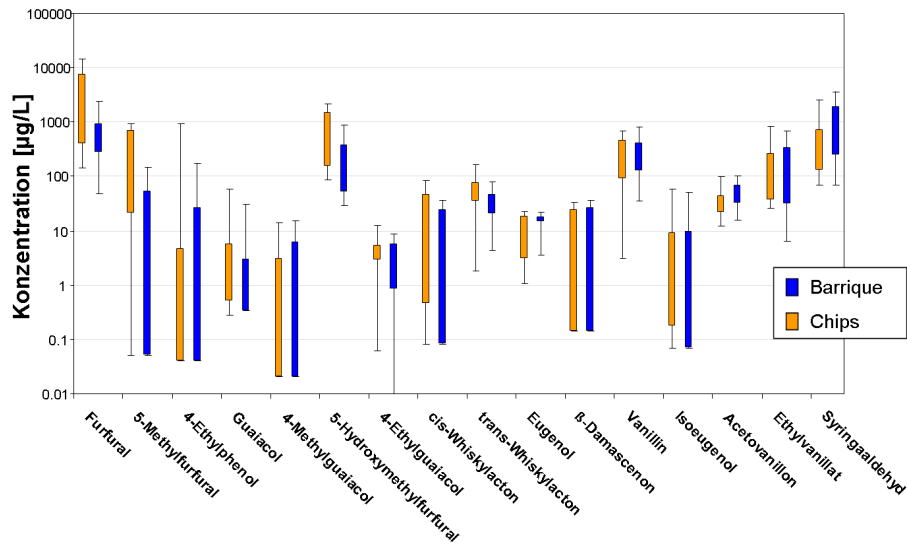


Abbildung 3.3: Mittelwerte und Standardabweichungen von ausgesuchten flüchtigen Verbindungen.

tration nicht möglich. Mittels multivariater statistischer Auswertungen wird das Augenmerk auf die Verhältnisse der Konzentrationen, also die relativen Gehalte zueinander gelegt. Aufgrund der in Kapitel 1 beschriebenen Ansatzpunkte ist zu erwarten, dass sich die Konzentrationen der einzelnen Stoffe zueinander bei beiden Gruppen unterscheiden. Die unterschiedliche Kontaktzeit, die Oberfläche Holz zur Oberfläche Wein und die Erhitzungsart haben einen Einfluss auf das Verhältnis der Gehalte der einzelnen Stoffe zueinander. Somit ist eine Einteilung der Proben in Gruppen möglich, da diese Verhältnisse ausschlaggebend bei der Klassifizierung sein können.

Zunächst wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, die ein hilfreiches statistisches Verfahren darstellt, um einen Überblick über den verwendeten Datensatz zu erhalten. Um eventuelle Tendenzen der Proben zu erkennen und Anhaltspunkte zu erhalten, welche Variablen einen Einfluss auf das Modell haben, wurde der Scoresplot (siehe Abbildung 3.4) und der Loadingsplot (siehe Abbildung 3.5) der PCA betrachtet.

Im Scoresplot sind die einzelnen Weine dargestellt, wobei die Koordinaten durch die ersten beiden berechneten Hauptkomponenten dieser Proben festgelegt sind. Es wurden die ersten beiden Hauptkomponenten zur Erstellung der Graphik verwendet, da in diesen die größte Varianz enthalten ist. Je näher die einzelnen Proben im Scoresplot beieinander liegen, desto ähnlicher sind sie sich bezüglich dieser beiden Hauptkomponenten. Im Gegenzug gilt auch, dass Proben, die weit voneinander entfernt liegen, sehr unterschiedlich bezüglich dieser beiden Haupt-

komponenten sind (Esbensen 2009).

In der Abbildung 3.4 ist zu erkennen, dass sich die beiden Gruppen (Chips und Barrique) deutlich unterscheiden. Wie man sieht, liegt die größte Trennkraft auf der zweiten Hauptkomponente (PC2), da die Abstände der beiden Gruppen in Richtung dieser Achse am größten sind. Die Chipsweine laden hoch auf die erste Hauptkomponente (PC1), das heißt sie haben Werte, die nahe bei 1 oder -1 liegen. Dementsprechend werden die Chipsproben hauptsächlich durch die erste PC erklärt, wohingegen die Barrique Weine auch auf die zweite Hauptkomponente hoch laden, also sowohl durch die erste, als auch die zweite PC erklärt werden. Die Inhomogenität der Punktwolke der Barriqueweine ist auf die sehr

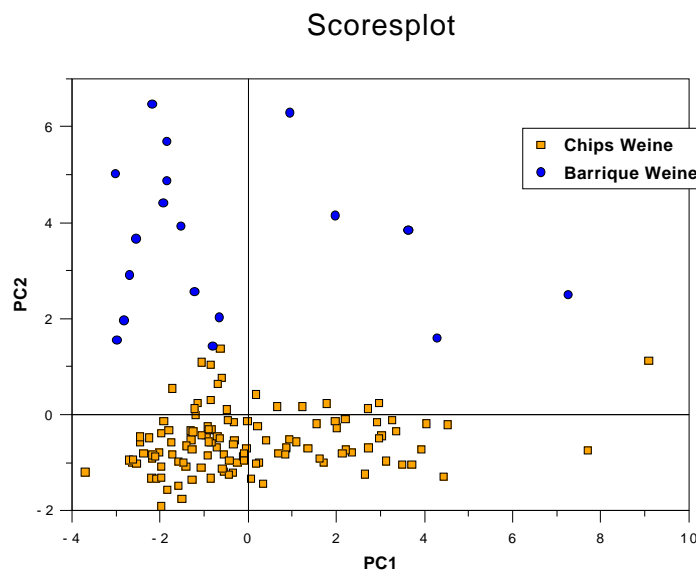


Abbildung 3.4: PCA Scoresplot der authentischen Weine. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Proben bezüglich der önologischen Verfahren (Chips oder Barrique).

unterschiedliche Herstellungsweise zurückzuführen. Zwar ist rein rechtlich eine Mindestdauer vorgegeben, während der der Wein in einem Barriquefass lagern muss (Weinverordnung 2009), jedoch kann dieser Zeitraum unbegrenzt ausgedehnt werden. Auf dem Markt werden Weine mit einer Lagerungsdauer von 12 und mehr Monaten angeboten. Es ist also keine Höchstdauer festgelegt. Außerdem ist zu beachten, dass Barriquefässer bis zu dreimal wiederbelegt werden können, um den Wein reifen zu lassen. Bei einer Drittbelegung ist der Gehalt an Holzinhaltstoffen wesentlich geringer als in Weinen, die in einem neuen Barriquefass gelagert waren. Hingegen werden Eichenholzchips immer in frischem Zustand verwendet, es findet also keine Mehrfachnutzung statt. Und auch das Zeitfenster

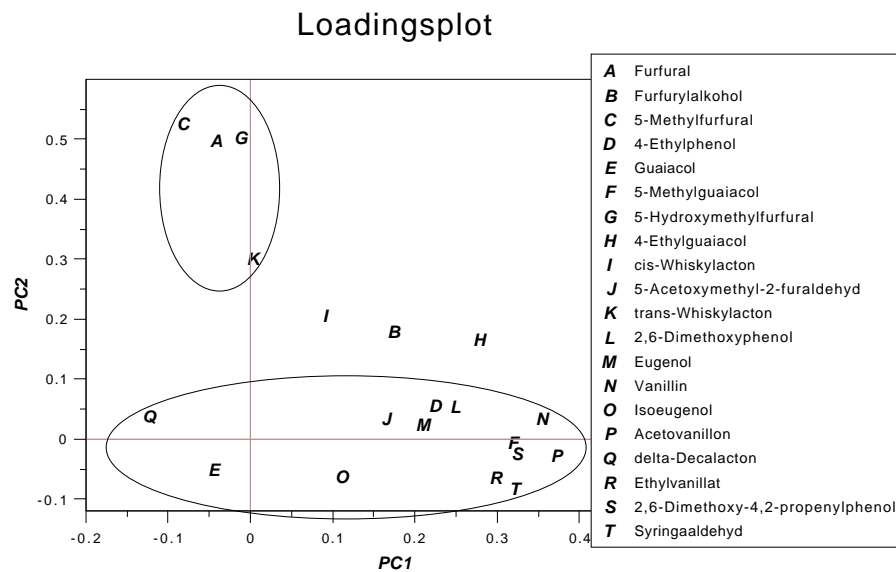


Abbildung 3.5: PCA Loadingsplot der authentischen Proben. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen Substanzen bezüglich der einzelnen Faktoren.

der Kontaktzeit bei einem Eichenholzchipseinsatz ist wesentlich kleiner als beim Barrique Ausbau. Eichenholzchips werden in der Regel nur zwischen zwei und acht Wochen im Wein belassen. Anhand des Loadingsplots (siehe Abbildung 3.5) kann man nun Schlüsse ziehen, welche der gemessenen flüchtigen Verbindungen dafür verantwortlich sind, dass eine Trennung in zwei Cluster stattgefunden hat. Man kann in diesem Plot und in der Berechnung erkennen, welche Variablen hoch auf die einzelnen PCs laden und somit für die Position der Scores im Scoresplot verantwortlich sind.

Man kann also den Scoresplot und den Loadingsplot miteinander in Verbindung setzen und Erkenntnisse erhalten, welche Variablen einen Einfluss auf die einzelnen Proben haben. Lädt beispielsweise eine Verbindung hoch auf eine Hauptkomponente und eine bestimmte Gruppe von Proben lädt ebenfalls auf diese Hauptkomponente hoch, enthält diese Verbindung viel Information der Gruppe. Wird dies auf die erstellten Plots übertragen, zeigt sich hierbei, dass einerseits die Furanverbindungen Furfural, 5-Methylfurfural und 5-Hydroxymethylfurfural (Buchstaben A, C und G) und andererseits *cis*- und *trans*-Whiskylacton (Buchstaben I und K) hoch auf die zweite Hauptkomponente laden und somit hauptsächlich die Barrique Weine erklären und für die Trennung von den Chips und Barriqueweinen verantwortlich sind.

Auf die erste Hauptkomponente laden die aromatischen Aldehyde Vanillin, Acetovanillon, Ethylvanillat und Syringaaldehyd (Buchstaben N, P, R und T) und die

Phenole 5-Methylguaiacol und 2,6-Dimethoxy-4,2-propenylphenol (Buchstaben F und S) hoch und erklären somit hauptsächlich die Gruppe der Chips Weine.

Der nächste Schritt in der statistischen Auswertung bestand in einer linearen Diskriminanzanalyse der authentischen Proben (16 Barrique Weine und 122 Chips Weine). Hierfür wurden die Weine vor der Analyse den beiden Gruppen Barrique bzw. Chips zugeordnet. Da bei zwei Gruppen in der Diskriminanzanalyse nur eine Diskriminanzvariable berechnet wird, wurde für die Darstellung in einem zweidimensionalen Plot die erste Hauptkomponente einer PCA der gleichen Proben, verwendet. Es wurde ein Scoresplot der einzelnen Proben erstellt. In Abbildung 3.6 sind die einzelnen Weine dargestellt und es ist deutlich die Trennung der beiden Gruppen zu erkennen. Um die Signifikanz des Modells

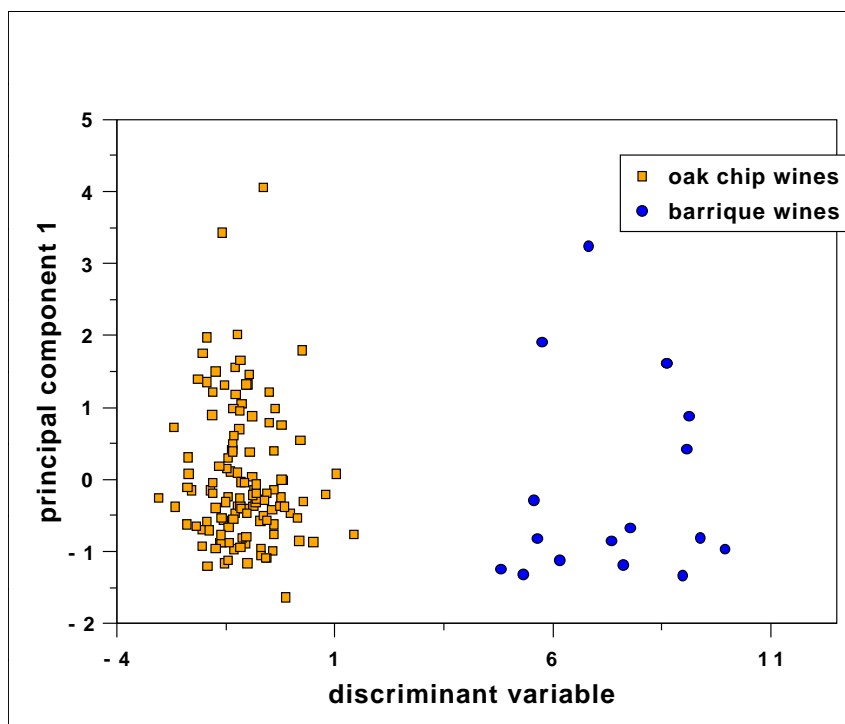


Abbildung 3.6: LDA Scoresplot der authentischen Weine. Das Koordinatensystem wird durch die Diskriminanzvariable der LDA und die erste Hauptkomponente der PCA erstellt

zu überprüfen, wurde eine Kreuzvalidierung durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine LDA gerechnet, jedoch wird jede Probe einmal ausgelassen und als unbekannte Probe im Modell gewertet. Daraus wird ersichtlich, wie viele der Weine der richtigen Gruppe zugeordnet werden können. In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Kreuzvalidierung dargestellt. Es wurden von den Chips Weinen 100% der vorgegebenen Gruppe zugeordnet. Bei den Barrique Weinen wurden

87,5% der richtigen Gruppe zugeordnet, also nur zwei der 16 Weine wurden fälschlicherweise als Chips Weine klassifiziert. Dieses Modell wurde nun mit Test

Kreuzvalidierung	Gruppe	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit		
		Chips	Barrique	Gesamt
Anzahl	Chips	122	0	122
	Barrique	2	14	16
Prozent %	Chips	100	0	100
	Barrique	12,5	87,5	100

Tabelle 3.3: Kreuzvalidierung der LDA Analyse mit authentischen Proben

Weinen, die eine bekannte Herstellung durchlaufen haben, aber nicht im Modell verwendet wurden, überprüft. Es wurden 10 Weine eingesetzt, die aus Riesling und Weißburgunder Trauben hergestellt wurden und jeweils fünf verschiedene önologische Behandlungen durchlaufen haben. Der Ausbau erfolgte in Barrique Fässern (zwei Proben), mit Eichenholzchips (sechs Proben) oder auch kombiniert im Barrique Fass und gleichzeitig mit Eichenholzchips (zwei Proben).

In Abbildung 3.7 ist das Modell zusammen mit den Test Weinen im Scoresplot zu sehen. Sowohl die Barrique Weine, als auch die Chips Weine werden den korrekten Gruppen zugeordnet. Die Weinen, die in Kombination im Barrique gleichzeitig mit Eichenholzchips behandelt wurden, liegen am Rand der Barrique Gruppe. Während der Lagerung im Barrique kann Sauerstoff in den Wein gelangen und somit einen Einfluss auf die Inhaltsstoffe haben. Dies könnte eine Erklärung für die Lage der Proben im Scoresplot sein (Waterhouse und Laurie 2006).

Zum Schluss wurden 47 deutsche Handelsweine analysiert. Von diesen waren 33 als Barrique Weine gekennzeichnet und 14 Weine waren mit Eichenholzchips behandelt. Die statistische Auswertung mit den gemessenen Daten ergab eine korrekte Zuordnung der Proben zu den beiden Gruppen Barrique bzw. Chips. In Abbildung 3.8 sind die Ergebnisse dieser Analyse dargestellt. Dabei ist allerdings auch zu beobachten, dass die beiden Weine, die sowohl im Barrique als auch gleichzeitig mit Eichenholzchips ausgebaut wurden, jetzt in der Punktwolke der kommerziellen Barrique Weine liegen. Dies zeigt, dass eine Trennung von Weinen, die ausschließlich im Barrique gereift wurden und solchen, die nur mit Eichenholzchips behandelt wurden, bezüglich der flüchtigen Holzinhaltstoffe möglich ist. Die Zuordnung von Weinen, die mit beiden Methoden hergestellt werden, ist jedoch schwierig. Um diese Problematik zu lösen, wurden weitere analytische Methoden ausprobiert. Die ^1H NMR ist dabei sehr vielversprechend, die erhalte-

nen Ergebnisse sind in Kapitel 3.3 dargestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Klassifizierung von Barrique Weinen und Chips Weinen anhand einer linearen Diskriminanz Analyse mit 20 ausgewählten flüchtigen Holzkomponenten möglich ist. Allerdings ist die Anzahl an authentischen Proben noch zu erweitern, beispielsweise auf Weine aus verschiedenen Ländern, auf Barrique Fässer aus anderen Regionen oder auch Weine, die mit Eichenholz Staves behandelt wurden.

Die weiterführenden statistischen Auswertungen wurden auf die Partial-Least-Squares (PLS) Analysen gestützt. Bei dieser Analyse handelt es sich um ein chemometrisches Verfahren, welches auch die Gruppenzugehörigkeit einzelner Proben berücksichtigt. Dieses Verfahren zählt zu den sogenannten *supervised* Techniken, bei welchen ein Lerndatensatz von authentischen Proben vor der statistischen Analyse in Gruppen eingeteilt wird, die einzelnen verwendeten Proben also mit Gruppencodes versehen werden. Aus dieser statistischen Auswertung lässt sich ein Modell erstellen, mit dem es möglich ist, unbekannte Proben zu analysieren und zu klassifizieren.

Es wurde bei dieser Analyse mit der reduzierten Variablenanzahl von 20 Verbin-

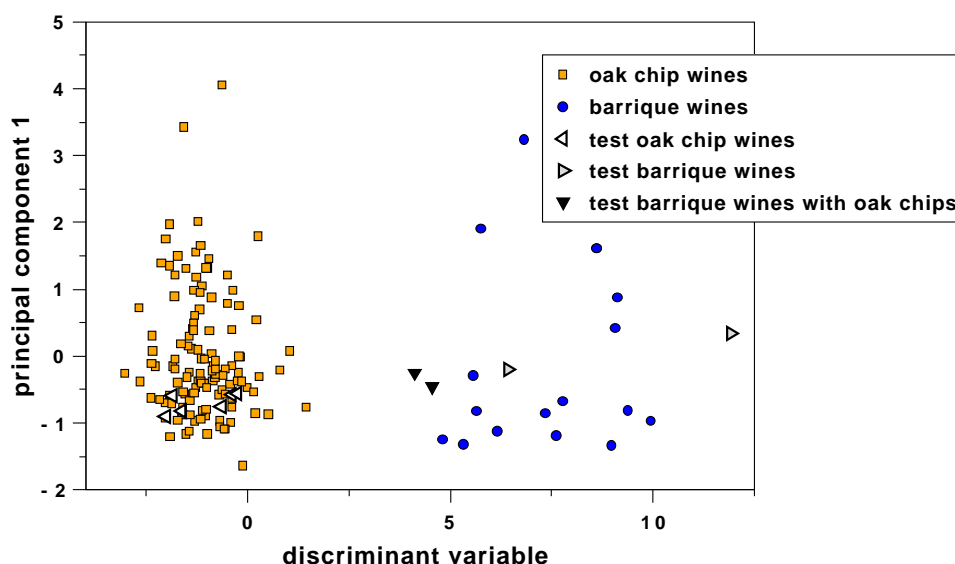


Abbildung 3.7: LDA Scoresplot der authentischen Weine zusammen mit den eingesetzten Test Weinen. Korrekte Klassifizierung der Barrique Weine und der Chips Weine. Die Weine, die gleichzeitig im Barrique mit Eichenholzchips behandelt wurden, liegen am Rand der Barrique Gruppe

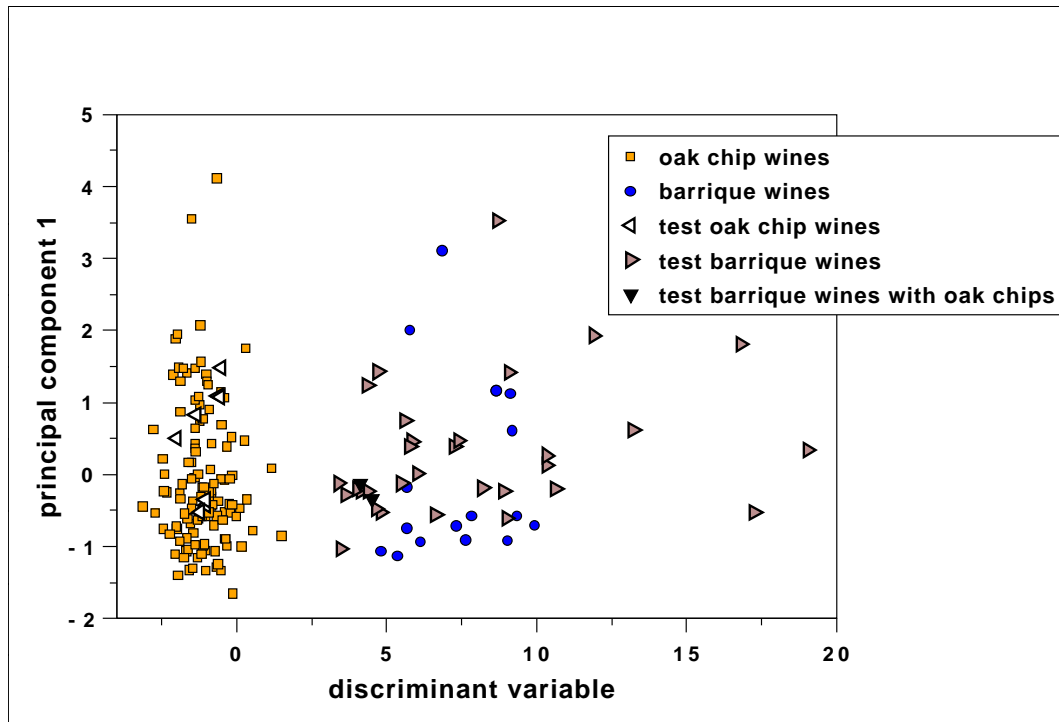


Abbildung 3.8: LDA Scoresplot der authentischen Weine zusammen mit den eingesetzten Test Weinen und den Handelsweinen. Die Handelsweine werden korrekt klassifiziert.

dungen gearbeitet. Das Modell, das erstellt wurde, bestand aus authentischen Proben. Es wurden 22 Barrique Weine und 136 Chips Weine eingesetzt. Die ungleiche Anzahl an Proben resultiert daraus, dass Chips Weine in kürzerer Zeit und günstiger als Barrique Weine hergestellt werden können und es somit einfacher war, authentische Chips Weine als Barrique Weine zu beziehen. Die authentischen Weine stammen von verschiedenen Forschungsanstalten und Winzern, die die komplette Herstellung belegen können. Bei den einzelnen Proben wurden möglichst unterschiedliche Herstellungsverfahren miteinbezogen, um eine möglichst große Stichprobe zu erhalten. Es wurden unterschiedliche Chipsarten (Größe, Toastungsart und Herkunft) und Weine (verschiedene Weiß- bzw. Rotweine) verwendet. Auch wurden bei den Barrique Weinen unterschiedliche Barrique Fässer (Herkunft, Toastungsart, Belegungszeitpunkt) und Weine (verschiedene Weiß- bzw. Rotweine) eingesetzt. Es ist jedoch anzumerken, dass durch die unterschiedlichen Herstellungsverfahren manche Proben wie Ausreißer erscheinen können, jedoch mit berücksichtigt werden müssen, da bei dem Naturprodukt Wein sehr unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten sind.

Die PLS Analysen wurden mit der Software Unscrambler von Camo durchgeführt. Die Ergebnisse der GC-MS Analyse wurde in eine Tabelle übertragen. In

diese Tabelle wurden sowohl die authentischen als auch die unbekannten Proben eingetragen. Waren Werte nicht bestimmbar oder lagen diese unterhalb der Bestimmungsgrenze, wurden diese Werte durch die halbe Bestimmungsgrenze der jeweiligen Variable ersetzt. Die Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Um eine PLS Auswertung zu starten, muss die Matrix der Daten entsprechend vorbereitet werden. Die Daten wurden dafür in die Gruppen „authentische“ Proben und „unbekannte“ Proben unterteilt. Innerhalb der Gruppe „authentische Proben“ wurde eine weitere Unterteilung in Chips Weine und Barrique Weine vorgenommen. In der Gruppe der „unbekannten Proben“ wurden die Weine in B-authentische Chips Weine, B-authentische Barrique Weine, Barrique Weine, die mit Chips versetzt wurden, Holzfass Weine, die mit Chips versetzt wurden, in unbekannte Chips Weine und in unbekannte Barrique Weine eingeteilt. Die Einteilung der Proben ist in Tabelle 3.4 dargestellt. In der Matrix wurde eine zusätzliche

Gruppe	Untergruppe	Anzahl
authentische Proben	Chips Weine	136
	Barrique Weine	22
unbekannte Proben	B-authentische Chips Weine	18
	B-authentische Barrique Weine	18
	Barrique Weine mit Chips	2
	Holzfass Weine mit Chips	2
	unbekannte Chips Weine	3
	unbekannte Barrique Weine	47

Tabelle 3.4: Eingesetzte Proben für die PLS Analyse der GC-MS Ergebnisse

Spalte eingefügt, in der die sogenannte *dummy*-Variable, auch Y-Variable genannt, für die authentischen Proben aufgeführt ist. Diese Variable kann nur diskrete numerische Werte annehmen. In diesem Fall wurden die Chips Weine mit einer 1 versehen und die Barrique Weine mit einer -1. Bei den unbekannten Proben bleibt diese Spalte frei, damit sie bei der statistischen Analyse als unbekannte Proben erkannt werden. Die *dummy*-Variable ist bei der späteren Modellbildung wichtig, da dieser Gruppencode die Zugehörigkeit der authentischen Proben zu einer Gruppe ausdrückt. Bei der Berechnung des Modells mit authentischen Proben werden die gemessenen Werte der einzelnen Proben einer Gruppe so lange miteinander kombiniert, bis alle Proben einer Gruppe möglichst einen berechneten Wert um 1 bzw. -1 aufweisen (Eriksson et al. 2001; Esbensen 2009; Westerhuis et al. 1998).

In das Modell werden bei der Analyse die authentischen Proben eingesetzt, also eine Matrix aus 158 Zeilen und 20 Spalten. Dies entspricht den GC-MS Ergebnissen von 136 Chips Weinen und 22 Barrique Weinen mit den 20 ausgewählten Variablen. Diese Matrix enthält die unabhängigen Variablen, die tatsächlich gemessen wurden. Weiterhin wird die Matrix eingesetzt, die die *dummy*-Variablen enthält. Diese Matrix enthält die abhängigen Variablen, die vorher festgelegt wurden.

Vor der Analyse wurden die Daten der Matrix transformiert, um größere Varianzunterschiede auszugleichen. Hierfür wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben zentriert, das heißt der Mittelwert (μ) der Stichprobe einer Variable wird von jedem einzelnen gemessenen Wert (X) abgezogen. Anschließend wird jeder einzelne zentrierte Wert standardisiert. Dafür werden die erhaltenen Werte durch die Standardabweichung (σ) der Stichprobe geteilt (siehe Gleichung 3.1). Durch dieses Verfahren der Standardisierung haben alle Werte eine Standardabweichung von 1 (Bro und Smilde 2003; van den Berg et al. 2006).

Die so erhaltenen Werte werden in die PLS Analyse eingesetzt. Als maximale Faktorenzahl wurde 20 angegeben, der Algorithmus, der angewendet wurde, war NIPALS. Bei der PLS Analyse wird versucht, möglichst viel der Varianz mit

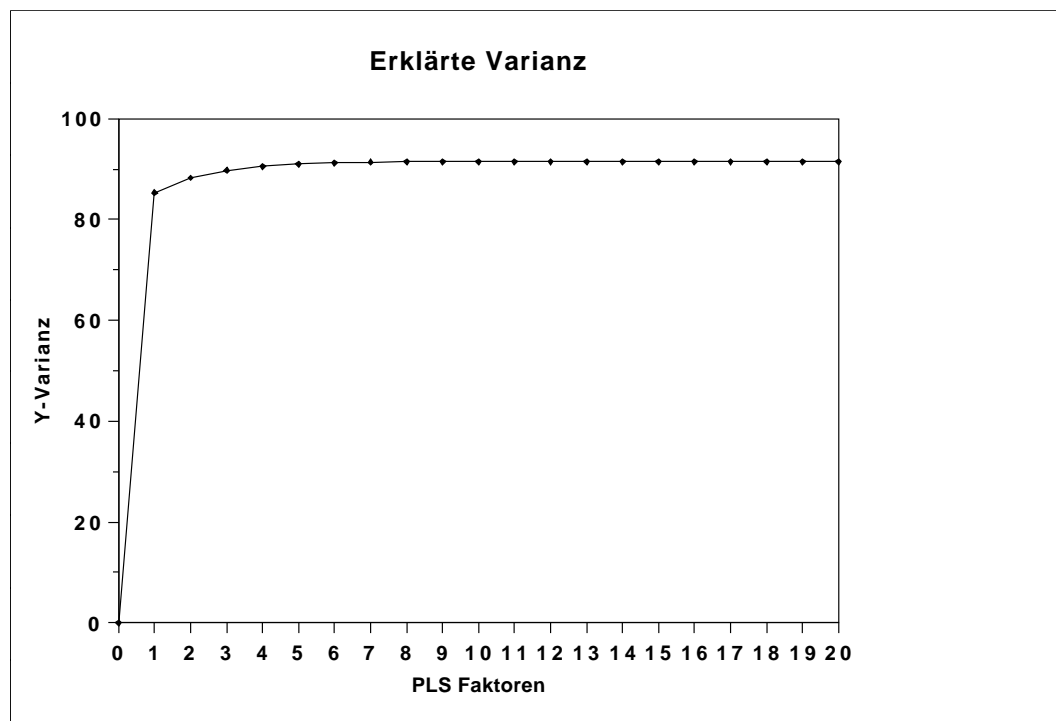


Abbildung 3.9: Erklärte Y-Varianz der einzelnen Faktoren der PLS Analyse der authentischen Proben

dem ersten errechneten Faktor zu erklären. Die folgenden Faktoren enthalten wiederum möglichst viel der Varianz, die noch verblieben ist. Bei der PLS Analyse der authentischen Proben wurden mit dem ersten Faktor 85% der Varianz erklärt, die weiteren Faktoren erklären noch etwa 5% der verbleibenden Varianz. In Abbildung 3.9 sind die Werte der erklärten Varianz (explained variance) graphisch dargestellt. Die Werte, die bei der PLS Analyse erhalten wurden, liegen bei den

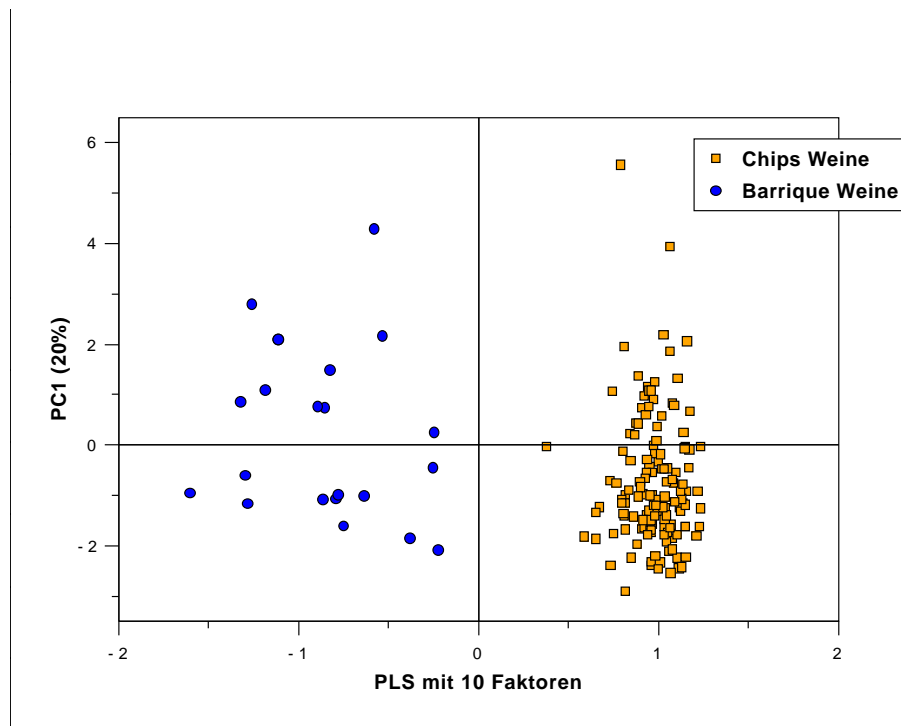


Abbildung 3.10: PLS Scores Plot der authentischen Proben. Das Koordinatensystem ist aufgespannt aus den zusammengefassten ersten 10 Faktoren der PLS Analyse und der ersten Hauptkomponente der PCA.

Chips Weinen um den Wert 1 und bei den Barrique Weinen um den Wert -1. Um die Ergebnisse graphisch darzustellen, wurde die erste Hauptkomponente der Hauptkomponentenanalyse als zweite Achse des Koordinatensystems verwendet. In der Abbildung 3.10 sind die einzelnen Proben bezüglich der ersten Hauptkomponente und zusammengefassten ersten 10 Faktoren der PLS Analyse dargestellt. Mit 10 Variablen werden 91,5% der Varianz erklärt. Die erklärte Varianz bei 20 Faktoren beträgt ebenfalls 91,5%. Bis zur Faktorenzahl von 10 war eine Steigerung in der Varianzerklärung zu erkennen. Daher führt eine Erhöhung der Faktorenzahl zu keiner Verbesserung der Ergebnisse.

Die Trennung in die Gruppen Chips und Barrique ist deutlich erkennbar. Allerdings ist in dieser Abbildung eine relativ große Streuung der Gruppe der Barrique Weine zu sehen. Dies kommt daher, dass eine möglichst große Stichprobe aus

einer möglichst umfangreichen Grundgesamtheit genommen wurde. Es handelt sich bei diesen Proben nicht um Ausreißer. Wein ist ein Naturprodukt, welches nicht einheitlich hergestellt werden kann. Der Grund für die größere Streuung der Barrique Weine im Gegensatz zu den Chips Weinen liegt darin, dass diese Weine sehr unterschiedlich lange in den Fässern lagern (6 - 24 Monate) (Weinverordnung 2009) und auch der Belegungszeitpunkt (1., 2. oder 3. Belegung) einen großen Einfluss auf die flüchtigen Komponenten hat. Die Anwendungsdauer von Eichenholzchips umfasst nur einen relativ kleinen Zeitraum (2 - 8 Wochen) und nur frisch hergestellte Chips werden verwendet.

Bei der PLS Analyse kann man sich, wie bei der PCA auch, einen Überblick über die Variablen anhand des Loadings Plots verschaffen. In Abbildung 3.11 sind die Loadings der einzelnen Variablen bezüglich der ersten beiden Faktoren dargestellt. Die Interpretation des Loadingsplots ist eine gute Methode, um wichtige Variablen

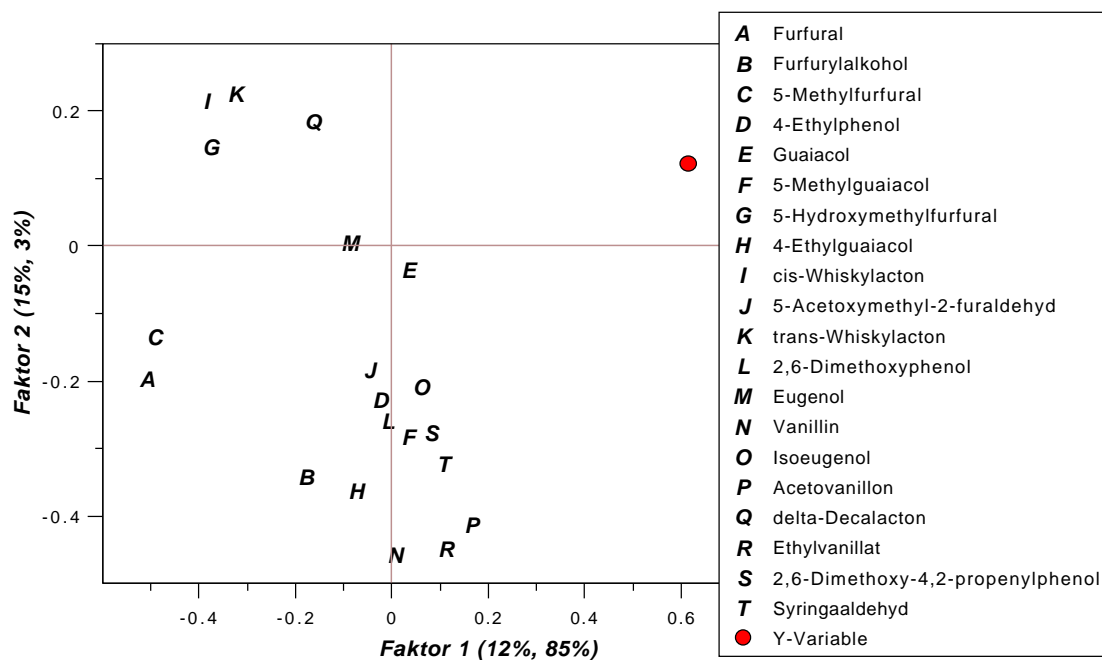


Abbildung 3.11: PLS Loadingsplot der authentischen Proben. Die Furanverbindungen A, C und G, sowie die Lactone I, K und Q und die aromatischen Aldehyde N, P, R und T tragen entscheidend zur Modellbildung bei.

zu erkennen und die Beziehungen der Variablen untereinander zu verstehen. Zur Veranschaulichung ist der zweidimensionale Scatterplot der Loadings gut geeignet, insbesondere, wenn man die Achsen durch die ersten zwei Faktoren

darstellen lässt, da diese die meiste Varianz erklären.

Variablen, die weit weg vom Ursprung liegen, bezüglich der ersten beiden Faktoren, erklären das Modell sehr gut. Verbindungen, die nahe dem Ursprung liegen, tragen wenig Information bezüglich des Modells und können in diesem Plot nicht interpretiert werden. Auch die *Dummy*-Variable ist in diesem Plot dargestellt. Diese liegt weit weg vom Ursprung des Modells, das heißt, dass diese Variable einen großen Einfluss auf die flüchtigen holzrelevanten Verbindungen hat.

Die Variablen, die für das Modell wichtig sind, sind die Furanverbindungen Furfural (A), 5-Methylfurfural (C) und 5-Hydroxymethylfurfural (G), sowie die Lactone *cis*-Whiskylacton (I), *trans*-Whiskylacton (K) und δ -Decalacton (Q) und die aromatischen Aldehyde Vanillin (N), Acetovanillon (P), Ethylvanillat (R) und Syringaaldehyd (T). Die Furanverbindungen laden vor allem auf den ersten Faktor hoch, ebenso die Lactone. Dagegen laden die aromatischen Aldehyde hoch auf den zweiten Faktor.

Interessant ist, dass die Mittelwerte der absoluten Konzentrationen bei den Furanverbindungen A, C und G bei den Barrique Weinen fast um das zehnfache höher lagen als bei den Chips Weinen. Bei den Lactonen waren die Mittelwerte der Barrique Gruppe ebenfalls höher als bei der Chips Gruppe, allerdings war der Unterschied nicht ganz so deutlich wie bei den Furanverbindungen. Die Konzentrationen waren um das zwei- bis vierfache höher. Bei den aromatischen Aldehyden N, P, R und T liegen, in den absoluten Konzentrationen, die Werte der Chips Weine im Mittel über denen der Barrique Weine. Der Unterschied der Konzentrationen fällt allerdings geringer aus als bei den Furanverbindungen und Lactonen.

In den Kapiteln 3.1.4 und 3.1.5 wurde in zwei unabhängigen Modellversuchen das Verhalten einiger holzrelevanter Substanzen bezogen auf Eichenholzchips und kleinen Eichenholzfässern untersucht. Beispielsweise ist bei den kleinen Barriques zu erkennen, dass der Wert für Syringaaldehyd nach ca. 12 Wochen einen Maximalwert aufweist, danach absinkt, bei 18 Wochen wieder etwas ansteigt, aber nicht über den Höchstwert steigt (siehe Abbildung 3.23). Da Eichenholzchips nur zwischen zwei und acht Wochen im Wein verbleiben und Barrique Weine zwischen drei und 24 Monaten im Fass bleiben, werden die höheren Gehalte an Syringaaldehyd in den Chips Weinen bestätigt. Diese Konzentrationsunterschiede und die damit in Verbindung gesetzten relativen Verhältnisse unter den einzelnen Substanzen tragen zur Trennung der beiden Gruppen bei.

Um das Modell zu überprüfen, wurde versucht, 10 Test Weine, die eine bekannte Herstellung durchlaufen haben, aber nicht im Modell verwendet wurden, einordnen zu lassen. Die Weine, die eingesetzt wurden, wurden aus Riesling und Weißburgunder Trauben hergestellt und durchliefen fünf verschiedene önologische Behandlungen. Der Ausbau erfolgte in Barrique Fässern (zwei Proben), mit Eichen-

Holz-Nr.	Rebsorte	önologische Behandlung	Predicted Y	PC1
150	Weißburgunder	Eichenholzchips in Stahltank	0,97	-1,80
151	Weißburgunder	Eichenholzchips in Stahltank	1,10	-1,89
152	Weißburgunder	Eichenholzchips in Holzfass	0,85	-1,86
153	Weißburgunder	Barrique Fass	-3,30	1,98
154	Weißburgunder	Eichenholzchips in Barrique Fass	-0,86	-0,45
156	Riesling	Eichenholzchips in Stahltank	0,60	-1,54
157	Riesling	Eichenholzchips in Stahltank	1,08	-1,97
158	Riesling	Eichenholzchips in Holzfass	0,67	-1,51
159	Riesling	Barrique Fass	-0,65	-0,43
160	Riesling	Eichenholzchips in Barrique Fass	-0,54	-0,61

Tabelle 3.5: Ergebnisse der PLS Prediction mit 10 Test Proben zur Überprüfung des erstellten Modells mit authentischen GC-MS Werten

holzchips (vier Proben), in Barriquefässern in Kombination mit Eichenholzchips (zwei Proben) und im Holzfass in Kombination mit Eichenholzchips (zwei Proben). Die Zuordnung der Proben erfolgte durch die Methode der PLS Prediction. Hierbei werden die Proben, die eingeordnet werden sollen, ohne *Dummy*-Variable in der Matrix eingetragen. Das vorher erstellte PLS Modell aus authentischen Proben wird als Grundlage verwendet und die Software berechnet danach die Zugehörigkeit der eingesetzten Test Proben zu einer der beiden Gruppen Barrique oder Chips.

Die errechneten Werte der PLS Prediction sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Ziel der Prediction ist es, die unbekannten Testproben möglichst einer der beiden Gruppen, die in diesem Modell eingesetzt wurden, zuzuordnen. Das heißt, dass möglichst ein Wert um 1 bzw. -1 erreicht werden soll. Die Analyse der Test Barrique Weine hat Werte von -3,30 bzw. -0,65 ergeben. Sie liegen also deutlich auf der Seite der Barrique Gruppe. Die Test Chips Weine liegen alle sehr nahe an 1. Die beiden Weine, die im Barrique Fass mit Eichenholzchips behandelt wurden, liegen mit -0,86 und -0,54 in der Gruppe Barrique. Dies zeigt, dass bezüglich der flüchtigen Holzinhaltsstoffe eine Probe, die im Barrique mit Chips behandelt wird, nicht erkannt werden kann. Auch konnten die beiden Proben, die im Holzfass mit Eichenholz-

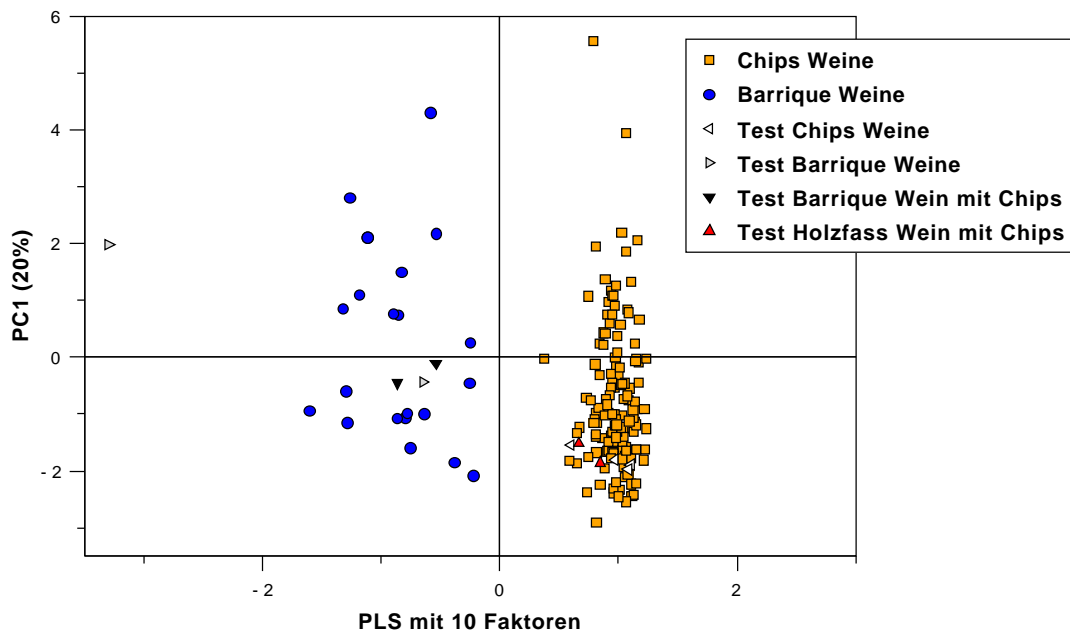


Abbildung 3.12: PLS Prediction mit 10 Test Proben. Aufgetragen sind die zusammengefassten ersten 10 PLS Faktoren gegen die erste Hauptkomponente der Hauptkomponentenanalyse.

chips behandelt wurden, nicht erkannt werden.

In Abbildung 3.12 sind die eingesetzten Test Proben im Modell dargestellt. Deutlich zu sehen ist, dass sowohl die Test Barrique Weine als auch die Test Chips Weine den richtigen Gruppen zugeordnet wurden, auch wenn die Barriqueproben mehr streuen. Die beiden Proben, die im Barrique Fass mit Eichenholzchips (Test Barrique Wein mit Chips) hergestellt wurden, konnten nicht als solche Proben erkannt werden, sie liegen in der Barrique Gruppe. Die beiden Proben, die im Holzfass und mit Eichenholzchips (Test Holzfass mit Chips) hergestellt wurden, konnten ebenfalls nicht als solche erkannt werden, diese beiden Weine liegen in der Gruppe Chips.

Es lassen sich also Weine, die entweder nur mit Eichenholzchips behandelt wurden oder nur im Barrique ausgebaut wurden, mit dem erstellten Modell bezüglich der flüchtigen Holzinhaltstoffe korrekt zuordnen. Eine Eingruppierung von kombinierten Proben stellt sich mit diesem Modell als schwierig dar. In diesem Fall zeigte die ^1H NMR Analytik vielversprechende Ergebnisse (siehe Kapitel 3.3). Es ist aber anzumerken, dass diese Ergebnisse bezüglich der Klassifizierung nicht als

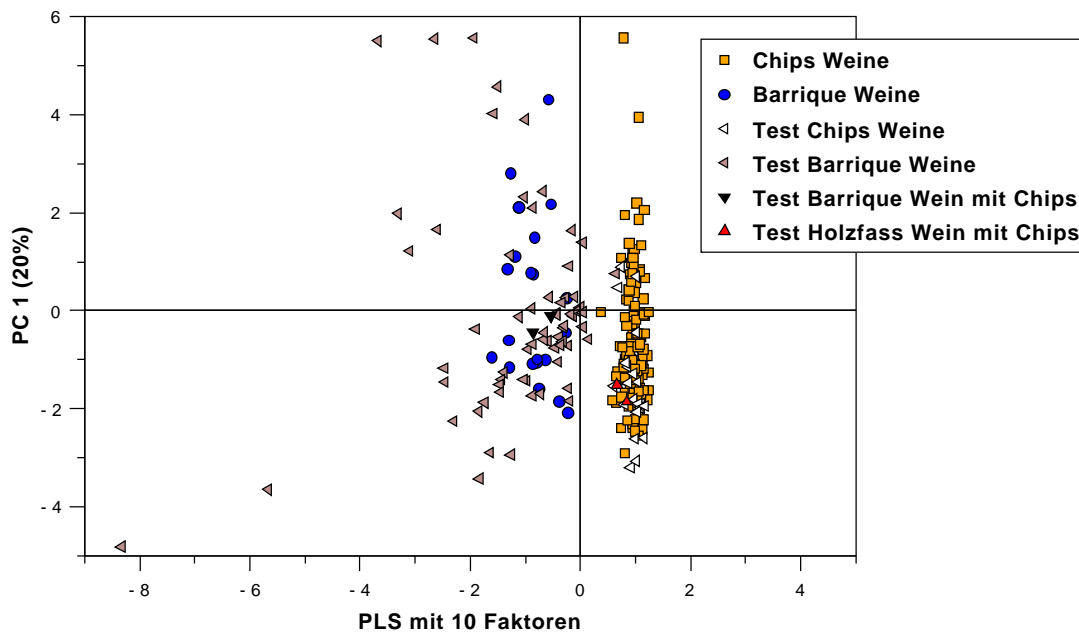


Abbildung 3.13: PLS Prediction mit 93 Proben, die sich aus den 10 Test Proben und den 83 Handelsproben zusammensetzen. Aufgetragen sind die zusammengefassten ersten 10 PLS Faktoren gegen die erste Hauptkomponente der Hauptkomponentenanalyse.

absolut zu werten sind, sondern diese Methode als Screeningverfahren zu betrachten ist. In der Praxis heißt das, dass ein Wein, der als Barrique gekennzeichnet wurde und im Modell als Chips klassifiziert wurde, nochmals betrachtet werden muss. Zunächst wird die Messung auf Fehler überprüft; ist kein Fehler vorhanden, wird die Probe nochmals aufgearbeitet und vermessen. Fällt dieser Wein wieder auf, wird der Hersteller kontaktiert oder von der Weinkontrolle aufgesucht, um eventuelle Unregelmäßigkeiten aufzuklären.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden nun 83 Handelsproben untersucht und diese mit dem erstellten Modell klassifiziert. Die Weine stammen aus dem Handel und von Winzern aus der Region und sind in der Matrix als B-authentische Proben und unbekannte Proben gekennzeichnet. Zusätzlich zu den 10 Testproben wurden 19 Eichenholzchips Weine und 64 Barrique Weine untersucht.

In Abbildung 3.13 sind das verwendete Modell zusammen mit den analysierten Test Proben und Handelsweinen dargestellt. Die statistische Analyse ergab, dass von den 83 Handelsweinen 78 korrekt zugeordnet werden konnten, wobei alle

Chips Weine aus dem Handel richtig zugeordnet und von den Barrique Weinen aus dem Handel 59 von 64 richtig klassifiziert werden konnten.

Auffällig ist die große Streuung der Test Barrique Weine. Ein Grund hierfür sind die unterschiedlichen Bedingungen, die bei einem Barrique Ausbau eine Rolle spielen. Dies sind einerseits die Art der Belegung (1., 2. oder 3. Belegung) der Fässer, andererseits die Dauer der Belegung. Diese kann zwischen drei Monaten und zwei Jahren liegen (Weinverordnung 2009). Diese Einflüsse haben einen starken Einfluss auf die Zusammensetzung der flüchtigen holzrelevanten Inhaltsstoffe im Wein.

In der Gruppe der Chips Weine liegen die Proben deutlich näher beieinander. Dies liegt daran, dass beim Einsatz von Eichenholzchips in jedem Fall frische Chips verwendet werden, also keine Wiederverwendung stattfindet und außerdem die Verweildauer kürzer als bei Barrique Weinen ausfällt. Diese liegt im Durchschnitt zwischen 2 und 8 Wochen. Daher werden die Konzentrationen der holzrelevanten Inhaltsstoffe innerhalb der Gruppe Chips deutlich weniger bei der Herstellung beeinflusst.

3.1.3 Chips Alterungsversuche

Im Hinblick auf mögliche Veränderungen von Chips bei längerer Lagerung und Einwirkung von Luft (z. B. nach Anbruch einer Originalpackung), ging es in diesem Versuch darum, ob und welche Veränderungen des Aromaprofils, insbesondere Verluste bestimmter sehr leicht flüchtiger Komponenten auftreten. Diese Fragestellung ist interessant für Winzer, die mit Eichenholzchips arbeiten, welche meist nur in größeren Gebinden zu beziehen sind und daher oft längere Zeit beispielsweise Licht oder Sauerstoff ausgesetzt sind. Es wurde versucht, eine künstliche Alterung durch Warmlagerung von verschiedenen Chipsproben zu erzielen. Da bei diesen Modellversuchen auch unterschiedlich lange Verweilzeiten der Chips im Wein und verschiedene Chipssorten (Holzherkunft, Toastungsgrad, Chipsgröße) zum Einsatz kamen (siehe Tabelle 3.6), sind die Ergebnisse dieser Modellversuche auch noch für weitere statistische Auswertungen interessant.

Versuchsvorbereitung

Je 5 g Chips der jeweiligen Sorte wurden in ein Porzellanschälchen eingewogen und in den auf 40°C vorgeheizten Trockenschrank gestellt. Die Chips wurden für 7 Tage im Trockenschrank belassen. Nach dem Herausnehmen wurden je 1,25 g

Bezeichnung	Bedeutung
Schließmann L	Schließmann leicht getoastet, deutsche Eiche
Schließmann M	Schließmann medium getoastet, deutsche Eiche
Schließmann S	Schließmann stark getoastet, deutsche Eiche
Schließmann AE	Schließmann medium getoastet, amerikanische Eiche
Oakyvin AM	Oakyvin medium getoastet, amerikanische Eiche
Oakyvin FM	Oakyvin medium getoastet, französische Eiche
Oakyvin DM	Oakyvin medium getoastet, deutsche Eiche

Tabelle 3.6: Verwendete Chipssorten für die Alterungsversuche

der Eichenholzstücke in vier 0,5 L Flaschen gegeben. Je zwei Flaschen wurden anschließend mit Weißwein bzw. Rotwein (beides ohne Holzkontakt) aufgefüllt (siehe Kapitel 4.1.2), wobei eine Flasche für die Lagerdauer 7 bzw. 11 Tage verwendet wurde und die zweite Flasche für die Lagerdauer 20 bzw. 32 Tage.

Durchführung

Die Verweildauer der Chips im Wein betrug 7, 11, 20 und 32 Tage. Nach 7 Tagen wurden die Weine homogenisiert und aus der jeweiligen Flasche ca. 150 mL entnommen, zweifach mittels SPE (siehe Kapitel 4.1.9) aufgearbeitet und mit GC-MS (siehe Kapitel 4.1.7) analysiert. Der Wein, der in der Flasche übrig war, verblieb mit den enthaltenen Chips bis zum zweiten Entnahmetermin. Bei diesem wurde der komplette Wein von den Chips abgezogen und wiederum zweifach aufgearbeitet und vermessen.

Um feststellen zu können, wie sich die Aromastoffe verhalten, wenn die Eichenholzstücke künstlich gealtert werden, wurde der gleiche Versuch mit Chips durchgeführt, die nicht künstlich gealtert worden waren. Die Lagerdauer betrug ebenfalls 7, 11, 20 und 32 Tage. Auch bei diesem Versuch wurden die Proben jeweils doppelt aufgearbeitet und mit der gleichen Methode vermessen. Die Probenentnahme erfolgte wie im Absatz vorher beschrieben.

Ergebnisse

Ziel dieses Alterungsversuchs war es, herauszufinden, ob ein signifikanter Unterschied zwischen Weinen mit gealterten Chips und Weinen mit frischen Chips besteht. Die Ergebnisse der Analyse wurden zunächst in Excel übertragen und anschließend mittels SPSS, Winstat für Excel und Unscrambler ausgewertet (siehe Kapitel 4.5).

Substanz	frische Chips			gealterte Chips		
	Mittelwert in $\mu\text{g/L}$	Median in $\mu\text{g/L}$	Standard- abweichung	Mittelwert in $\mu\text{g/L}$	Median in $\mu\text{g/L}$	Standard- abweichung
Furfural	2444	1088	2236	1949	907	1657
Furfurylalkohol	3693	719	3648	3056	658	2870
5-Methylfurfural	196	82	187	184	76	171
4-Ethylphenol	1	0	1	1	0	1
Guaiacol	4	4	4	4	5	22
4-Methylguaiacol	6,0	5	7	7	4	6
5-Hydroxymethyl- furfural	1819	768	1610	2278	721	2187
4-Ethylguaiacol	5	3	5	6	3	5
E-Whiskylacton	15	24	9	20	13	21
5-Acetoxymethyl- 2-furaldehyd	17	11	17	20	9	18
Z-Whiskylacton	44	38	28	49	43	35
2,6-Dimethoxyphenol	28	10	27	30	13	28
Eugenol	16	3	14	15	4	15
Vanillin	479	177	454	501	242	468
Isoeugenol	31	29	27	34	27	28
Acetovanillon	48	16	48	51	22	49
1-(4-Hydroxy-3- methoxyphenyl)-Aceton	90	65	78	94	80	60
Ethylvanillat	101	42	103	97	58	83
2,6-Dimethoxy-4- (2-propenyl)-phenol	19	13	17	20	17	15
Syringaaldehyd	2296	855	2217	2066	1000	1820

Tabelle 3.7: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Weißweine mit frischen bzw. gealterten Eichenholzchips

Substanz	frische Chips			gealterte Chips		
	Mittelwert in $\mu\text{g/L}$	Median in $\mu\text{g/L}$	Standard- abweichung	Mittelwert in $\mu\text{g/L}$	Median in $\mu\text{g/L}$	Standard- abweichung
Furfural	1694,6	1090,9	1627,4	1686,1	736,7	1609,6
Furfurylalkohol	2077,5	577,0	2037,0	669,9	584,8	297,2
5-Methylfurfural	164,8	84,8	48,2	177,9	83,4	142,9
4-Ethylphenol	77,5	19,1	72,8	35,9	8,4	34,7
Guaiacol	8,8	4,9	7,7	6,8	4,2	6,3
4-Methylguaiacol	8,0	4,0	7,7	7,3	3,6	7,4
5-Hydroxymethyl- furfural	1469,4	790,9	1400,4	1248,3	736,6	1095,3
4-Ethylguaiacol	27,6	9,3	23,6	14,0	5,2	12,4
cis-Whiskylacton	21,2	15,2	13,7	25,7	15,0	21,9
5-Acetoxymethyl- 2-Furaldehyd	14,2	9,3	14,1	18,9	11,3	16,7
trans-Whiskylacton	45,9	35,6	31,8	53,8	42,6	39,7
2,6-Dimethoxyphenol	39,6	12,5	34,8	38,2	14,2	35,6
Eugenol	15,7	2,5	15,1	16,0	2,9	15,5
Vanillin	479,9	213,8	467,1	500,3	261,4	455,1
Isoeugenol	12,0	21,8	0,0	20,6	25,2	14,8
Acetovanillon	73,3	23,5	70,2	69,0	31,5	64,8
1-(4-Hydroxy-3- methoxyphenyl)-Aceton	87,0	66,8	64,0	91,9	75,1	73,4
Ethylvanillat	190,2	74,4	177,2	173,2	81,3	167,1
2,6-Dimethoxy-4- (2-propenyl)-phenol	23,7	13,6	22,2	22,5	15,8	19,0
Syringaaldehyd	2513,9	853,6	2450,4	1888,6	912,1	1895,4

Tabelle 3.8: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Rotweine mit frischen bzw. gealterten Eichenholzchips

Zunächst wurden die Ergebnisse monovariat betrachtet. Hierbei sind in Tabelle 3.7 die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane der Weißweine, die mit frischen und gealterten Chips behandelt wurden, zu sehen. In Tabelle 3.8 sind die Werte der Rotweine, die mit frischen und gealterten Chips versetzt wurden, zu sehen. Hierbei ist anzumerken, dass die Standardabweichungen bei beiden Versuchsreihen relativ hoch ausfallen. Dies liegt daran, dass die verwendeten Eichenholzstücke sehr unterschiedlich waren. Es wurde versucht, eine möglichst große Stichprobe aus der Grundgesamtheit zu entnehmen und somit wurden unterschiedliche Chipsgrößen, Holzherkünfte und Toastungsgrade miteinbezogen.

Deutlich wird hierbei, dass sowohl bei den Weißweinen als auch bei den Rotweinen die Konzentration an Furfural bei der Alterung der Chips abnimmt. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass diese Verbindung sehr leicht flüchtig ist und bei der Erhitzung der Chips verloren geht. In der Literatur wird beschrieben, dass medium getoastete Eichenholzchips die höchste Konzentration an flüchtigen Verbindungen aufweisen. Eine weitere Erhitzung, wie bei stark getoasteten Eichenholzchips, kann vor allem bei leicht flüchtigen Verbindungen zu einem Konzentrationsverlust führen (Hale et al. 1999).

Vor der multivariaten statistischen Auswertung wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben skaliert und zentriert, um größere Varianzunterschiede auszugleichen, da diese das Ergebnis der Analyse verfälschen könnten.

Beim Zentrieren der Daten wird der Mittelwert der Stichprobe von jeder einzelnen Variablen abgezogen. Hierbei werden die Daten gegen den Mittelwert verschoben, das heißt, dass der Mittelwert der Daten gleich null ist. Die Skalierung von Daten ist eine Vorbehandlung, bei der die einzelnen Daten durch einen bestimmten Faktor geteilt werden. Dieser kann unterschiedliche Werte annehmen. Bei der gängigsten Methode, dem textitautoscaling, auch *unit variance scaling* genannten Verfahren, entspricht der Faktor der Standardabweichung. Durch dieses Verfahren haben alle Werte eine Standardabweichung von 1 (Bro und Smilde 2003; van den Berg et al. 2006). In den nachfolgenden Auswertungen wurden alle Daten zunächst zentriert, das heißt der Mittelwert (μ) der Stichprobe einer Variable wurde von jedem einzelnen gemessenen Wert (X) abgezogen. Anschließend wurde jeder einzelne zentrierte Wert durch die Standardabweichung (σ) der Stichprobe geteilt (siehe Gleichung 3.1).

Anschließend wurde eine Hauptkomponentenanalyse am Datensatz der Rotweine durchgeführt, um eventuelle Tendenzen im Muster der Daten zu erkennen. Diese statistische Analyse ist hilfreich, um einen Überblick über den Datensatz zu bekom-

men. In der Hauptkomponentenanalyse wird eine Varianzmaximierung angestrebt und die ursprüngliche Datenmatrix so transformiert, dass die darin enthaltene Information in kompakterem Maße zusammengefasst wird.

Die so erhaltenen Hauptkomponenten lassen sich dazu verwenden, die einzelnen Proben in einem neuen Koordinatensystem darzustellen. Zur Veranschaulichung wurde ein Scatterplot, auch Scoresplot genannt, erstellt (siehe Abbildung 3.14), der die Scores (die Werte der neu erhaltenen Datenmatrix) der einzelnen Proben darstellt. Die Koordinaten sind durch die ersten beiden Hauptkomponenten

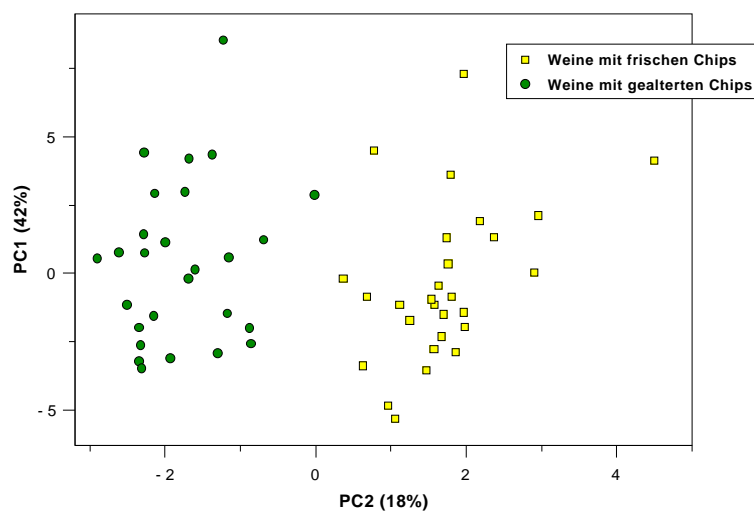


Abbildung 3.14: PCA Scoresplot: Chipsalterungsversuch mit Rotweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Proben bezüglich gealterten und nicht gealterten Chips.

(in diesem Fall der einzelnen Proben) festgelegt. Diese wurden zur Erstellung der Graphik verwendet, da in den beiden ersten PCs die meiste Varianz enthalten ist. Durch die erste Hauptkomponente werden 42% der Varianz erklärt und durch die zweite Hauptkomponente weitere 18%. Das heißt, dass in diesem Modell durch die Transformation der Daten 60% der Information der ursprünglichen Datenmatrix enthalten ist. Nimmt man noch drei Hauptkomponenten hinzu, werden sogar 85% der gesamten Information erklärt. Somit lässt sich die ursprüngliche Datenmatrix deutlich vereinfachen.

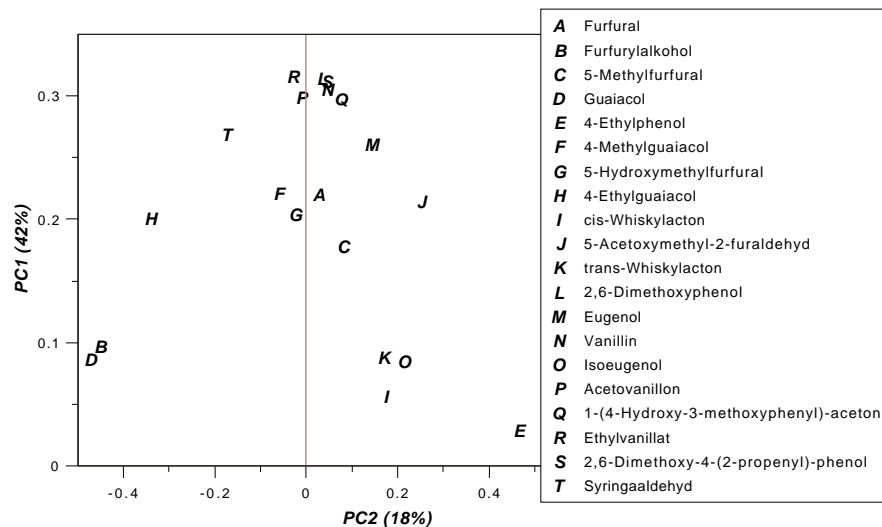


Abbildung 3.15: PCA Loadingsplot: Chipsalterungsversuch mit Rotweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen Variablen bezüglich der einzelnen PCs.

Je näher die einzelnen Proben im Scoresplot beieinander liegen, desto ähnlicher sind sie bezüglich der beiden Hauptkomponenten. Im Gegenzug gilt auch, dass Proben, die weit voneinander entfernt sind, sehr unterschiedlich sind bezüglich der beiden Hauptkomponenten (Esbensen 2009). In diesem Fall wurde im Scoresplot eine Trennung von gealterten und nicht gealterten Chips in Rotweinen ersichtlich. Die Trennungsinformation liegt auf der zweiten Hauptkomponente.

Im Loadingsplot (siehe Abbildung 3.15) ist zu erkennen, welchen Einfluss einzelne Substanzen in der Hauptkomponentenanalyse haben. Da die gleichen Achsen wie im Scoresplot verwendet wurden, ist es möglich, diese beiden Plots miteinander in Verbindung zu setzen. Die Aufspaltung in gealterte und nicht gealterte Chips beruht auf der zweiten Hauptkomponente, PC2. Somit haben die Verbindungen, die hoch auf die zweite Hauptkomponente laden, das heißt hohe Werte (sowohl negativ als auch positiv) aufweisen, einen großen Einfluss auf die Trennung der Proben. In diesem Fall sind dies die Verbindungen Guaiacol (D), Furfurylalkohol (B), Ethylguaiacol (H) und Syringaaldehyd (T), die die Weine mit gealterten Chips gut erklären und Eugenol (M), 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (J), cis-Whiskylacton (I), trans-Whiskylacton (K), Isoeugenol (O) und 4-Ethylphenol (E), die die Weine mit frischen Chips gut erklären.

Zur weiteren Analyse wurden die Daten sowohl der Weißweine als auch der Rotweine einer Partial Least Squares Regression (PLS-Regression) unterzogen. Bei

dieser Analyse handelt es sich um ein chemometrisches Verfahren, welches auch die Gruppenzugehörigkeit einzelner Proben berücksichtigt. Dieses Verfahren zählt zu den sogenannten *supervised* Techniken, da die einzelnen Proben mit Gruppen-codes vor der eigentlichen Analyse versehen werden.

Vor der multivariaten statistischen Auswertung wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben standardisiert und zentriert, um die größere Varianzunterschiede auszugleichen, da diese das Ergebnis der Analyse verfälschen könnten. Hierfür wurde der Mittelwert (μ) der Stichprobe einer Variable von jedem einzelnen gemessenen Wert (X) abgezogen. Anschließend wurde jeder einzelne zentrierte Wert durch die Standardabweichung (σ) der Stichprobe geteilt. Die so erhaltenen Werte werden in die PLS Analyse eingesetzt. Als maximale Faktorenzahl wurde 20 angegeben, der Algorithmus, der angewendet wurde, war NIPALS.

Die PLS Analyse der Weißweine zeigte im erstellten Scoresplot (siehe Abbildung 3.16) eine deutliche Trennung der Proben mit gealterten und nicht gealterten Eichenholzchips. Das Koordinatensystem wird durch die beiden ersten Faktoren, auch latente Variablen oder PCs genannt, der PLS-Regression aufgespannt. Es wurden die beiden ersten Faktoren gewählt, da diese die meiste Information des Modells tragen. Je näher die einzelnen Proben im Plot beieinander liegen, desto ähnlicher sind sie sich, bezogen auf die beiden Faktoren. Entsprechend gilt, je weiter entfernt einzelne Weine voneinander liegen, desto unterschiedlicher sind sie, bezogen auf die beiden verwendeten Faktoren. Bei den Weißweinen sind zwei Cluster zu erkennen. Die Weine, die mit frischen Eichenholzchips versetzt waren, laden hauptsächlich positiv auf den ersten Faktor, und die Weine, die mit gealterten Chips behandelt waren, laden überwiegend negativ auf den ersten Faktor. Beide Varianten laden sowohl positiv als auch negativ auf den zweiten Faktor. Die höchste Trennleistung liegt somit auf dem ersten Faktor.

Liegen einzelne Proben im Scoresplot weit entfernt von den anderen Proben, ist dies ein Anzeichen für Ausreißer. In diesem Fall ist es sinnvoll, diese Probe im einzelnen zu betrachten, ob ein Fehler in der Messung oder Auswertung liegt. In diesem Fall liegen die Proben zwar relativ weit gestreut, ein Ausreißer ist aber nicht erkennbar.

Die Interpretation des Loadingsplots ist eine gute Methode, um wichtige Variablen zu erkennen und die Beziehungen der Variablen untereinander herauszufinden. Zur Veranschaulichung ist der zweidimensionale Scatterplot der Loadings gut geeignet, insbesondere, wenn man die Achsen durch die ersten zwei Fakto-

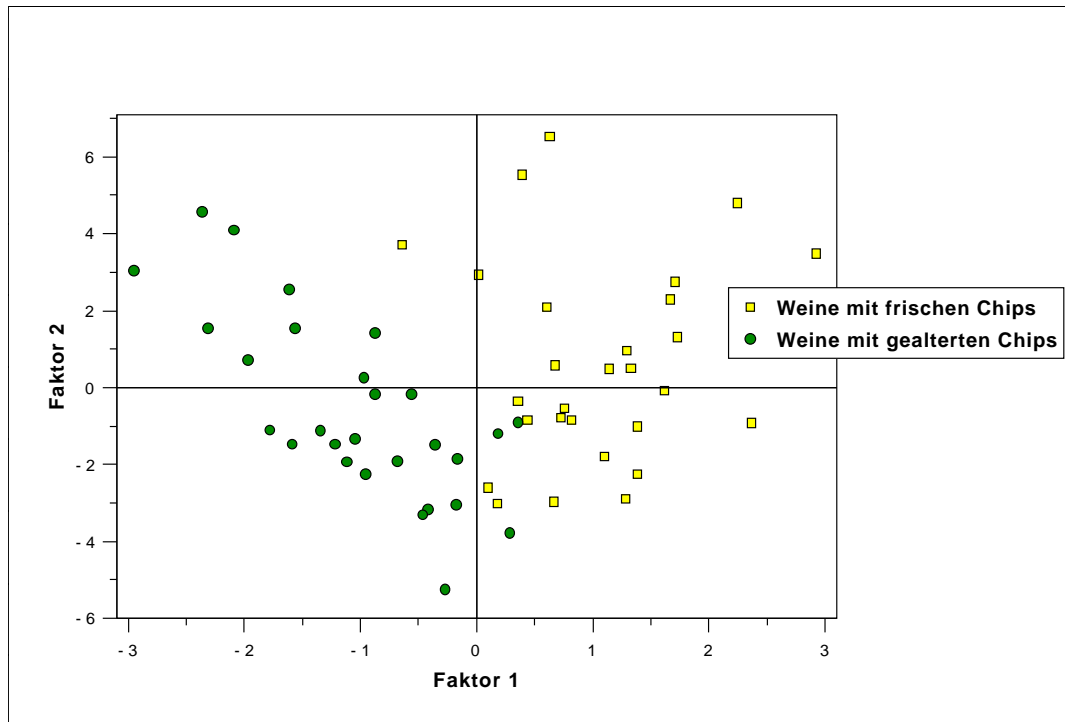


Abbildung 3.16: PLS Scoresplot: Chipsalterungsversuch mit Weißweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Proben bezüglich gealterten und nicht gealterten Chips.

ren darstellen lässt, da diese die meiste Varianz erklären. Der Loadingsplot und der Scoresplot können miteinander in Verbindung gebracht werden, wenn man die gleichen Faktoren gegeneinander aufrägt. So erklären Variablen, die weit weg vom Ursprung sind, bezüglich der ersten beiden Faktoren, das Modell sehr gut. Verbindungen, die nahe dem Ursprung liegen, sind von den aufgetragenen Faktoren schlecht erklärt und können in diesem Plot nicht interpretiert werden. Ein Vorteil des Statistikprogramms Unscrambler ist, dass nicht nur die ersten beiden Faktoren der PLS-Regression berechnet werden können, sondern theoretisch bis zu $n-1$ Faktoren. Aus diesen vielen Faktoren kann das Programm nun die Variablen herausrechnen, die für das Modell wichtig sind. So kann es beispielsweise sein, dass Variablen im Scatterplot der ersten beiden Faktoren in der Nähe des Ursprungs liegen, aber eine entscheidende Rolle im Modell spielen (Esbensen 2009).

In diesem Fall sind die Verbindungen, die signifikant zur Trennung der beiden Cluster beitragen, die Furanverbindungen Furfural, Furfurylalkohol und 5-Hydroxymethylfurfural, sowie die Phenole Guaiacol, 4-Methylguaiacol und 4-Ethylphenol und die aromatischen Aldehyde Vanillin und Syringaaldehyd (siehe Loadingsplot in Abbildung 3.17). Hierbei ist in den Tabellen 3.7 und 3.8 zu sehen, dass die Konzentrationen an Furfural, Furfurylalkohol, Guaiacol und Sy-

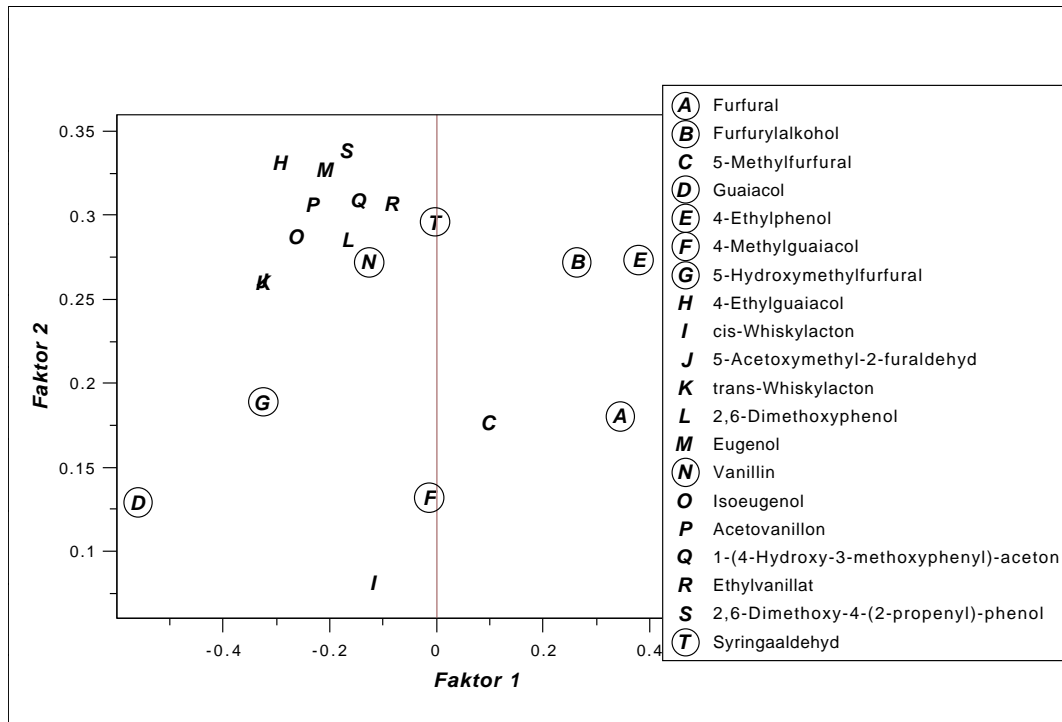


Abbildung 3.17: PLS Loadingsplot: Chipsalterungsversuch mit Weißweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Variablen bezüglich der beiden ersten Faktoren der PLS Analyse. Die Variablen, die mit ○ gekennzeichnet sind, tragen entscheidend zur Trennung der beiden Gruppen bei.

ringaldehyd in den Weinen mit Chipsalterung niedriger liegen als in den Weinen ohne Chipsalterung. Dagegen sind die Konzentrationen an 4-Ethylphenol, 4-Methylguaiacol, 5-Hydroxymethylfurfural und Vanillin in den Weinen mit Chipsalterung höher als in den Weinen ohne Chipsalterung.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die leichtflüchtigen Furanverbindungen bei der künstlichen Alterung durch die dabei angewendete Erwärmung auf 40°C verlorengegangen sind. Es wurden die acht Variablen herausgerechnet, die entscheidend zur Trennung der beiden Gruppen beitragen. Daher wurde in einem weiteren Rechenschritt die Variablenzahl auf die vorher genannten Verbindungen reduziert. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte, dass die Trennleistung sich sogar verbessert hat. In Abbildung 3.18 ist der Chipsalterungsversuch der Weißweine mit reduzierter Variablenzahl dargestellt. Das Modell liefert also mit der reduzierten Variablenzahl ein zufriedenstellendes Ergebnis. Durch die Verminderung der Variablenzahl konnte das Rauschen im Modell reduziert werden und der Aufwand der Messungen minimiert werden.

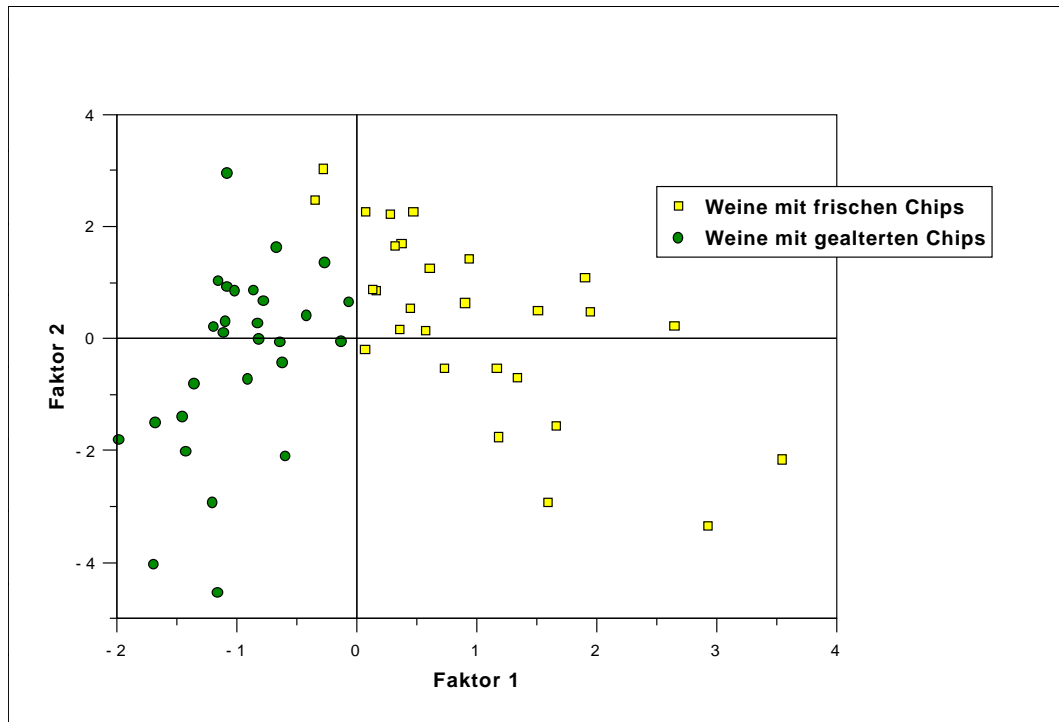


Abbildung 3.18: PLS Scoresplot: Chipsalterungsversuch der Weißweine mit reduzierter Variablenzahl.

Bei den Rotweinen ergab die PLS Analyse ein besseres Ergebnis. In diesem Fall ist eine klare Trennung der beiden Gruppen (gealterte und nicht gealterte Eichenholzchips) in Abbildung 3.19 im Scoresplot erkennbar. Das Koordinatensystem des Plots wird durch die beiden ersten Faktoren der PLS-Regression aufgespannt. Diese wurden gewählt, da sie die meiste Information des Modells tragen. Bei den Rotweinen sind zwei deutlich voneinander getrennte Cluster zu sehen, wobei die Proben, die mit den gealterten Chips behandelt wurde, sehr negativ auf die erste Hauptkomponente laden, dagegen laden die Proben, die mit frischen Eichenholzstücken behandelt wurden, deutlich positiv auf die erste Hauptkomponente. Beide Varianten laden sowohl positiv als auch negativ auf den zweiten Faktor. Die höchste Trennleistung liegt somit auf dem ersten Faktor. R^2Y der ersten Hauptkomponente, die hauptsächlich zur Trennung der beiden Gruppen beiträgt, enthält 85 % der gesamten Varianz. Innerhalb der Rotweine waren keine Ausreißer erkennbar.

Es wurde wiederum der Loadingsplot zur Auswertung der Rotweine herangezogen. Es gilt wiederum, dass Variablen, die weit vom Ursprung entfernt sind, bezüglich der aufgetragenen Faktoren einen großen Einfluss auf das Modell haben. Entsprechend sind Variablen, die nah beim Ursprung liegen, für das Modell bezüglich der aufgetragenen Faktoren nicht von Bedeutung. Wie zuvor bei den

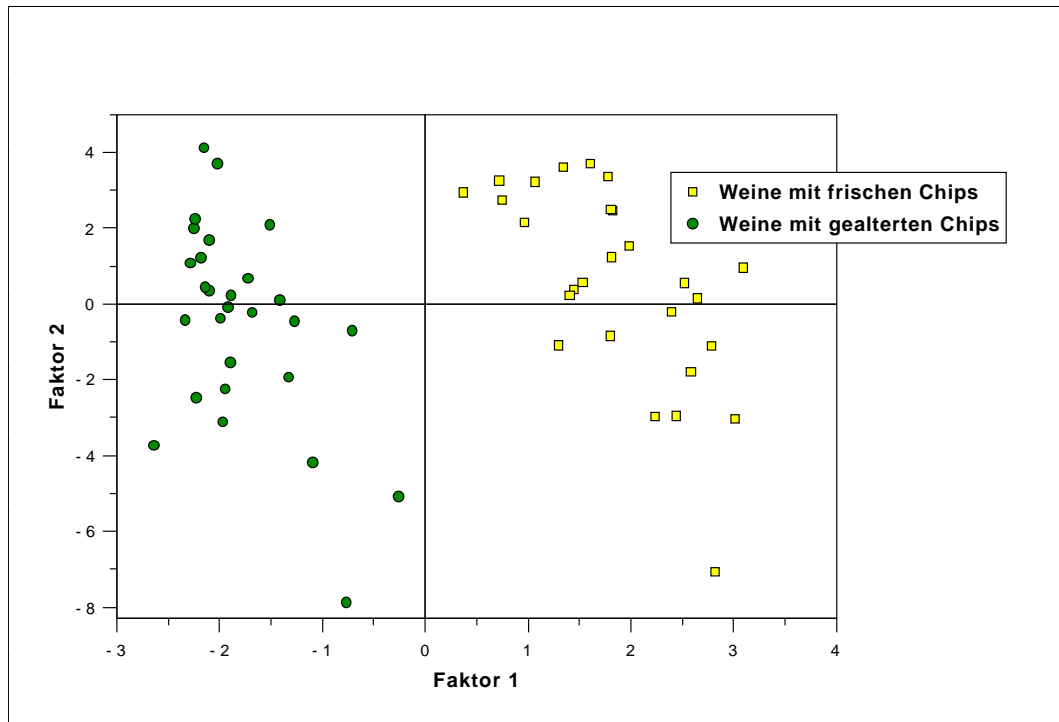


Abbildung 3.19: PLS Scoresplot: Chipsalterungsversuch mit Rotweinen. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Proben bezüglich gealterten und nicht gealterten Chips.

Weißweinen, wurden auch hier mittels Unscrambler die Variablen herausgerechnet, die bezüglich aller Faktoren im Modell die höchste Information beinhalten.

Signifikant zur Trennung der Gruppen trugen dabei fünf Variablen bei. Dies waren die Furanverbindung Furfurylalkohol, die Phenole 4-Ethyl-phenol, 4-Ethylguaiacol und Guaiacol, sowie der aromatische Aldehyd Vanillin bei (siehe Abbildung 3.20). Betrachtet man die Tabelle mit den Mittelwerten, so fällt auf, dass die Konzentration an Furfurylalkohol in den Weinen mit gealterten Chips nur noch ein Drittel der Konzentration in den Weinen mit frischen Eichenholzchips beträgt. Auch sind die Mittelwerte der Konzentrationen von Guaiacol und 4-Ethylguaiacol in den Weinen mit Chipsalterung niedriger als in den Weinen ohne Chipsalterung. Dahingegen sind die Mittelwerte der Konzentrationen von Vanillin und 4-Ethylphenol in den Weinen mit Chipsalterung gestiegen (siehe Tabellen 3.7 und 3.8). Allerdings reicht die Betrachtung der Mittelwerte einzelner Verbindungen nicht aus, um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu erkennen, denn die Varianz der einzelnen Verbindungen kann teilweise sehr hoch sein. Somit wird eine Unterscheidung schwierig.

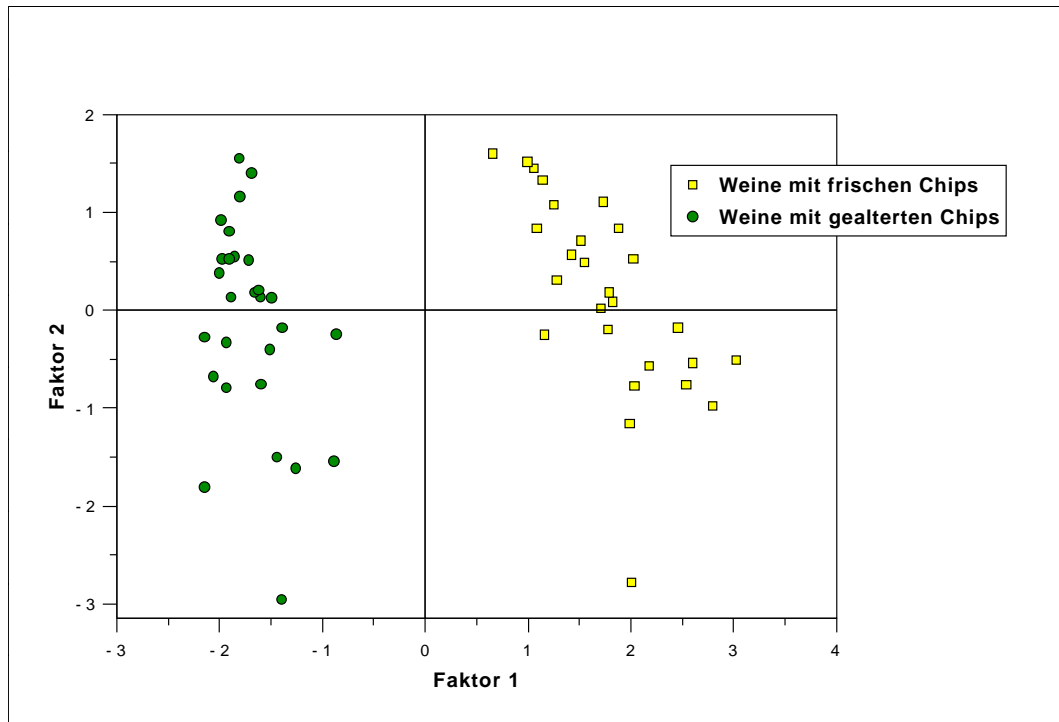


Abbildung 3.21: PLS Scoresplot: Chipsalterungsversuch der Rotweine mit reduzierter Variablenzahl.

3.1.4 Holzfassversuche mit kleinen getoasteten Eichenholzfässern

Mit diesem Versuch sollte durch die Befüllung von kleinen, 20 L fassenden Eichenholzfässern mit einem Modellwein ermittelt werden, welche Stoffe ausschließlich originär aus einem Eichenholzfass stammen. Hierfür wurden zwei Eichenholzfässer von Küfern aus der Region verwendet. Ein Fass wurde von der Firma Aßmann in Eußenheim aus Spessarteiche hergestellt. Das andere Fass stammt von der Fassfabrik Müller in Neustadt an der Aisch und wurde aus Steigerwaldeiche hergestellt.

Versuchsvorbereitung

Die neu gelieferten Fässer wurden nach Anleitung zunächst mit kochendem Wasser mehrfach ausgespült und anschließend mit kaltem Wasser befüllt, um die Fässer quellen zu lassen. Dies ist ein wichtiger Schritt, um die Fässer vor der Belegung mit Wein abzudichten. Die Fässer wurden mit dem in Kapitel 4.1.2 genannten Modellwein befüllt. Dieser wurde 6 Monate im Fass gelagert und je nach Verdunstung wurden die Fässer mit diesem Modellwein wieder aufgefüllt.

Durchführung

Von der Befüllung der Fässer wurden in einem Abstand von 6 Wochen Proben entnommen und mit der SPE-Methode, wie in Kapitel 4.1.9 beschrieben, aufgearbeitet. Anschließend wurden die Proben mit GC-MS untersucht, um die Zusammensetzung der flüchtigen holzrelevanten Stoffe sowie die Änderungen des Profils einzelner Komponenten zu bestimmen.

Ergebnisse

Anhand der Ergebnisse wurde deutlich, dass sich die Gehalte einiger Substanzen zum Teil erheblich von denen in handelsüblichen Barriqueweinen unterschieden. In Tabelle 3.9 sind die durchschnittlichen Gehalte der untersuchten Substanzen im Modellwein und in handelsüblichen Barriqueweinen dargestellt. Die Daten, die hierbei verwendet wurden, stammen aus den GC-MS Analysen der Modellweinbelegung der kleinen Barriquefässer (siehe Kapitel 4.4.1) und aus den GC-MS Messungen von Barrique Weinen aus dem Handel mit den Holznummern 1-46, 170, 173-178, 181, 182, 184, 187-192, 194 und 195 (siehe Tabelle A.1 im Anhang). Insgesamt wurden 64 kommerzielle Weine untersucht, von denen 57

Substanz	Kleine Barriquefässer		Handelsübliche Barriqueweine	
	Mittelwert in $\mu\text{g/L}$	Standard- abweichung	Mittelwert in $\mu\text{g/L}$	Standard- abweichung
Furfural	10206	8564	1523	2587
Furfurylalkohol	16	22	1843	3665
5-Methylfurfural	699	707	171	252
Guaiacol	7	5	2	3
4-Ethylphenol	0,2	0,2	20	85
4-Methylguaiacol	6	5	3	4
5-Hydroxymethylfurfural	3508	3409	411	566
4-Ethylguaiacol	5	3	7	9
cis-Whiskylacton	343	110	43	40,85
5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd	16	11	1	2
trans-Whiskylacton	637	275	102	77
2,6-Dimethoxyphenol	27	14	29	19
Eugenol	40	13	15	8
Vanillin	940	365	182	103
Isoeugenol	0	0	4	4
Acetovanillon	10	11	44	20
δ -Decalacton	0	0	5	6
1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-aceton	9	1	0,5	1
Ethylvanillat	3	5	303	278
2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol	9	9	15	14
Syringaaldehyd	3057	843	655	407

Tabelle 3.9: Durchschnittliche Konzentrationen (in $\mu\text{g/L}$) flüchtiger Stoffe in Modellweinen (13 % vol.) nach Erstbelegung von kleinen Barriquefässern (20 L) sowie in handelsüblichen Barriqueweinen.

Rotweine und 7 Weißweine waren.

Im Ganzen ist zu beobachten, dass die Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert relativ hoch ausfällt. Dies liegt daran, dass die Werte der beiden kleinen Barriquefässer zusammengekommen wurden und aufgrund der unterschiedlichen Hersteller und Holzherkünfte unterschiedliche Konzentrationen zu erwarten sind. Außerdem sind die Weine aus dem Handel sehr unterschiedlich (unterschiedliche Rebsorten, Jahrgänge, Belegung der Fässer). Es sollte aber eine möglichst große Stichprobe aus der Grundgesamtheit der Handelsweine einbezogen werden, um ein realistisches Bild der Holzinhaltsstoffe in kommerziellen Barrique Weinen zu erhalten.

Auffällig war bei den Werten, dass die Konzentrationen an Furfural, 5-Methylfurfural, 5-Hydroxymethylfurfural, cis- und trans-Whiskylacton, Vanillin und Syringaaldehyd in den Modellweinen deutlich über den Werten der kommerziellen Proben lagen. Dagegen lagen die Gehalte an Furfurylalkohol und Ethylvanillat der Modellweine deutlich unter den Konzentrationen der handelsüblichen Proben.

Vergleicht man nun die Werte der beiden Fässer, so zeigt sich, dass diese deutliche Unterschiede in einzelnen Komponenten aufwiesen. In Tabelle 3.10 sind die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der beiden Fässer dargestellt. Diese Werte wurden aus den gesammelten Ergebnissen der einzelnen Entnahmen berechnet. So ist erkennbar, dass die Konzentrationen der flüchtigen Komponenten im Fass des Herstellers Müller deutlich niedriger liegen als die im Fass des Herstellers Aßmann, mit Ausnahme der beiden Whiskylactone, deren Konzentrationen in den Fässern des Herstellers Müller über denen des Herstellers Aßmann liegen. Da beide Fässer aus deutschem Eichenholz gefertigt wurden, ist anzunehmen, dass die unterschiedliche Herstellung eine entscheidende Rolle spielt. Unter anderem hat die Eichenholzlagerung einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von flüchtigen Aromastoffen (Martínez et al. 2008).

Auch spielt die Herstellung der Fässer an sich eine große Rolle bezüglich der flüchtigen Holzinhaltsstoffe. Beide Fässer waren mit dem Toastungsgrad „medium“ bestellt worden. Allerdings ist dieser Begriff relativ ungenau. Denn bei der traditionellen Herstellung werden die halb geschlossenen Fässer auf dem offenen Feuer für eine bestimmte Zeit erhitzt. Dieser Vorgang ist jedoch von Küfer zu Küfer verschieden. Es kann sowohl die Hitze unterschiedlich sein als auch die Ausbrenndauer variieren. Bei verschiedenen Toastungsgraden können die Konzentrationen

Substanz	Holzfass Aßmann			Holzfass Müller		
	Mittelwert in µg/L	Median in µg/L	Standard- abweichung	Mittelwert in µg/L	Median in µg/L	Standard- abweichung
Furfural	18596,7	17936,6	2764,6	1814,7	1877,3	404,3
5-Methylfurfural	1389,9	1324,3	249,0	8,8	9,0	5,5
Guaiacol	12,1	10,9	3,9	2,8	3,0	1,6
4-Ethylphenol	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1
4-Methylguaiacol	11,0	10,3	2,7	1,1	1,1	0,1
5-Hydroxymethyl furfural	6783,101	6595,4	1522,7	232,3	186,8	267,2
4-Ethylguaiacol	7,8	7,6	1,7	2,1	2,1	0,1
<i>cis</i> -Whiskylacton	246,0	269,4	72,1	439,4	436,1	48,3
5-Acetoxymethyl- 2-furaldehyd	26,3	23,8	5,3	6,4	8,5	4,3
<i>trans</i> -Whiskylacton	380,7	403,4	110,3	894,2	919,3	115,2
2,6-Dimethoxyphenol	39,3	39,4	10,0	14,7	14,7	0,2
Eugenol	27,5	27,7	3,8	53,3	52,1	4,3
Vanillin	1273,4	1254,0	233,1	607,3	612,7	75,5
Acetovanillon	20,4	18,8	5,2	0	0	0
1-(4-Hydroxy-3-me- thoxyphenyl)-aceton	81,9	78,2	20,2	5,2	5,3	1,3
Syringaaldehyd	3819,9	3680,1	527,9	2293,8	2207,8	250,4

Tabelle 3.10: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Modellweine in den beiden 20 L Eichenholzfässern der Hersteller Aßmann und Müller.

der flüchtigen Inhaltsstoffe sehr unterschiedlich ausfallen (Jordão et al. 2006; Fernández de Simón et al. 2010).

Um die Konzentrationen an flüchtigen Inhaltsstoffen in den beiden Fässern noch zu verdeutlichen, sind in Abbildung 3.22 die Konzentrationsverläufe der Verbindungen *cis*- und *trans*-Whiskylacton nebeneinander dargestellt.

Bei beiden Holzfässern ist der Verlauf der Kurve ähnlich, jedoch liegen die Konzentrationen beim Hersteller Müller deutlich über denen des Herstellers Aßmann. Bei der ersten Entnahme lag die Konzentration am niedrigsten, diese stieg bei der zweiten Entnahme weiter an, um bei der dritten Entnahme wieder abzufallen. Beim vierten Entnahmetermine ist die Konzentration wieder leicht gestiegen. In der Literatur wird beschrieben, dass die Konzentrationen an flüchtigen Verbindungen zu Beginn ansteigen und nach einer Zeit von etwa vier Monaten wieder zurückgehen (Ortega-Heras et al. 2004; Herjavec et al. 2007). Der Konzentrationsverlauf der kleinen Fässer läuft genauso wie in der Literatur beschrieben ab. Ähnlich verhält sich der Konzentrationsverlauf bei den beiden Aldehyden Vanillin und Syringaaldehyd (siehe Abbildung 3.23). Auch hier steigt die Kurve zunächst

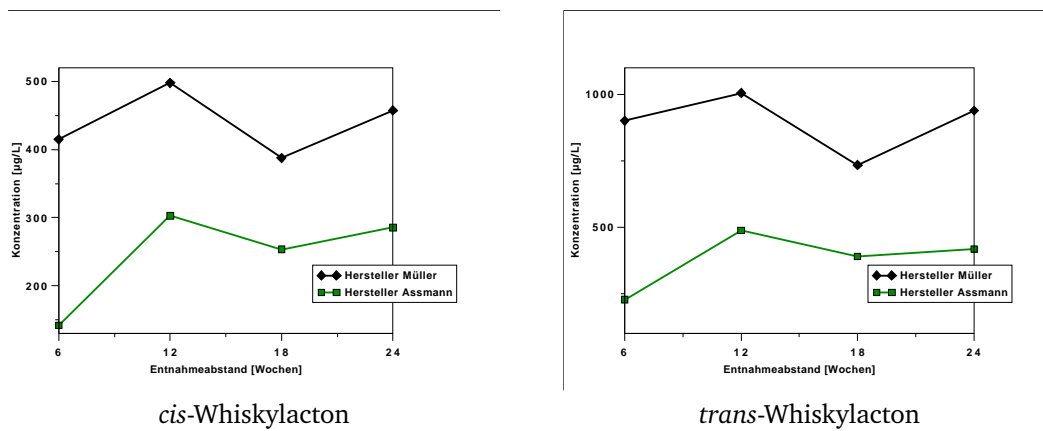


Abbildung 3.22: Verlauf der Konzentrationen bei den einzelnen Entnahmetermen von *cis*- bzw. *trans*-Whiskylacton in den 20 L Eichenholzfasern der Hersteller Müller und Aßmann.

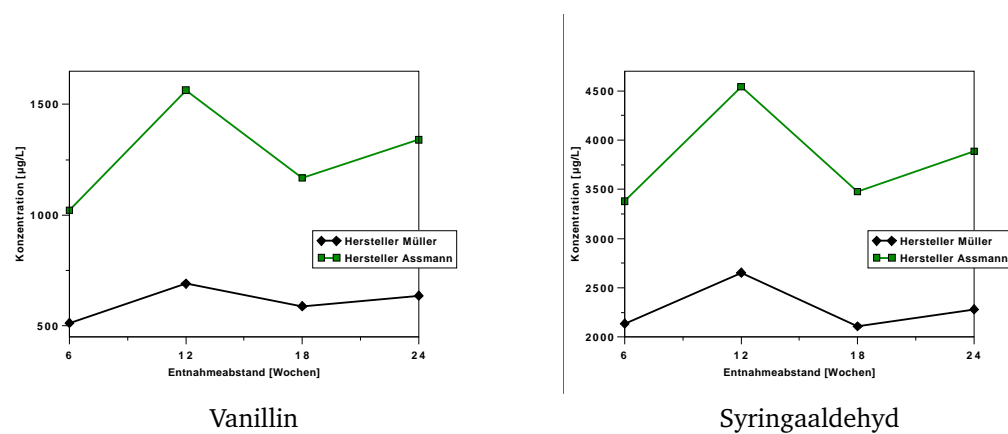


Abbildung 3.23: Verlauf der Konzentrationen bei den einzelnen Entnahmetermen von Vanillin und Syringaaldehyd in den 20 L Eichenholzfasern der Hersteller Müller und Aßmann.

an, um anschließend abzufallen und am Ende wieder leicht anzusteigen. Jedoch liegen in diesem Fall die Konzentrationen im Fass des Herstellers Müller unter denen des Herstellers Aßmann.

3.1.5 Sauerstoff/SO₂-Versuch

Dieser Versuch wurde angesetzt, um eine Aussage treffen zu können, wie sich Sauerstoff auf die Entwicklung von Weinen mit Chipskontakt auswirkt und welche Rolle die Schwefelung darin spielt. Hierbei ging es darum, was genau eine unterschiedlich starke Schwefelung in Verbindung mit Sauerstoff bzw. ohne Sauerstoff bezüglich der flüchtigen Holzinhaltstoffe bewirkt. Außerdem wurde der Einfluß der unterschiedlichen Toastungsarten der verwendeten Eichenholzchips auf den Wein untersucht.

Versuchsvorbereitung

Für diesen Versuch wurde ein Wein der Rebsorte Portugieser aus dem Jahr 2008 von der bayerischen Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau verwendet. Dieser wurde in vier Teile aufgeteilt. Ein Teil wurde nicht mit Eichenholzchips behandelt, ein Teil wurde mit leicht getoasteten Chips, ein Teil mit medium getoasteten Chips und ein Teil mit stark getoasteten Chips versetzt. Die Menge an zugesetzten Eichenholzchips betrug je 12 g/L Wein. Vor dem eigentlichen Versuch wurden die Chips vom Wein abgezogen. Jeder dieser Teile wurde in zwei weitere Teile aufgeteilt und jeweils schwach (ca. 40 mg/L) und ausreichend (ca. 80 mg/L) mit Kaliumpyrosulfit ($K_2S_2O_5$) geschwefelt. Die einzelnen Proben umfassten ein Volumen von je 10 L, die in je einen Glasballon gefüllt wurden. In diesen Gruppen erfolgt nun eine Sauerstoffzugabe zu je einem Teil des Weins (siehe Tabelle 3.11).

Durchführung

Die Sauerstoffsättigung erfolgte einmal pro Woche, indem je ein Liter aus einem 10 L Gebinde entnommen wurde, in ein 2,5 L Gefäß gegeben wurde und in diesem für 30 Sekunden kräftig geschüttelt wurde. Dieser Wein wurde anschließend wieder in den entsprechenden 10 L Ballon zurückgeführt und somit der restliche Wein mit Sauerstoff angereichert. Nach dem Rückverschnitt ist im Ballon eine Sauerstoffkonzentration von 0,8-0,9 mg/L zu erwarten. Dies wurde im Vorfeld getestet und der Sauerstoffgehalt an einer Modelllösung überprüft. Bei dieser Methode

Bezeichnung	Ansatz	Bedingung	Schwefelung
A1	ohne Chips	ohne Sauerstoff	schwach geschwefelt
A2	ohne Chips	ohne Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
A3	ohne Chips	mit Sauerstoff	schwach geschwefelt
A4	ohne Chips	mit Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
B1	Chips leicht	ohne Sauerstoff	schwach geschwefelt
B2	Chips leicht	ohne Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
B3	Chips leicht	mit Sauerstoff	schwach geschwefelt
B4	Chips leicht	mit Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
C1	Chips medium	ohne Sauerstoff	schwach geschwefelt
C2	Chips medium	ohne Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
C3	Chips medium	mit Sauerstoff	schwach geschwefelt
C4	Chips medium	mit Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
D1	Chips stark	ohne Sauerstoff	schwach geschwefelt
D2	Chips stark	ohne Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
D3	Chips stark	mit Sauerstoff	schwach geschwefelt
D4	Chips stark	mit Sauerstoff	ausreichend geschwefelt

Tabelle 3.11: Übersicht der Ansätze zur Prüfung des Einflusses von Sauerstoff und Schwefel auf das Profil flüchtiger Stoffe im Holz.

handelt es sich um einen periodischen Sauerstoffeintrag. Im Abstand von 2 bis 3 Wochen erfolgte eine Analyse der flüchtigen Bestandteile in diesen Versuchsweinen mittels der GC-MS Methode aus Kapitel 4.1.5 und 4.1.9. Die Proben wurden nach jeder Entnahme mit dem gleichen Grundwein wieder auf das Grundvolumen von 10 L aufgefüllt.

Ergebnisse

Nach jeder Sauerstoffanreicherung im Abstand von 2 bis 3 Wochen wurden Proben von etwas mehr als 50 mL gezogen und mittels GC-MS vermessen (siehe Kapitel 4.1.5 und 4.1.9). In Tabelle 3.12 sind die Mittelwerte, die Mediane und die Standardabweichungen der einzelnen Probenblöcke zusammengefasst. Die Probenblöcke umfassen die Gruppe ohne Chips, mit leicht getoasteten Chips, medium getoasteten Chips und stark getoasteten Chips. Es wurden alle Ergebnisse in dieser Tabelle zusammengefasst. Bei den Weinversuchen ohne Holzkontakt waren die gemessenen Verbindungen nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar bzw. nicht detektierbar. Je stärker die Eichenholzchips getoastet waren, desto höher waren auch die gemessenen Konzentrationen an Holzinhaltsstoffen. Insbesondere die Furan-Derivate sind in den stärker getoasteten Chips vermehrt vertreten. Bereits in früheren Veröffentlichungen ist eine Zunahme an Furan-Derivaten bei stärkerer Toastung nachgewiesen worden (Vichi et al. 2007). Interessant ist in Abbildung

Substanz	Mittelwert in µg/L	ohne Chips		Standard- abweichung	Chips leicht getoastet		Standard- abweichung	Chips medium getoastet		Standard- abweichung	Chips stark getoastet		Standard- abweichung
		Median in µg/L	Median in µg/L		Mittelwert in µg/L	Median in µg/L		Mittelwert in µg/L	Median in µg/L		Mittelwert in µg/L	Median in µg/L	
Furfural	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	23,27	0,00	32,24	20,45	0,00	28,04
Furfurylalkohol	85,90	49,24	99,28	101,77	85,55	91,30	1051,95	1094,44	718,03	976,73	993,04	655,07	0,00
5-Methylfurfural	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	51,69
Phenylacetaldehyd	64,68	66,36	46,54	76,51	65,81	50,76	70,12	65,01	37,32	89,21	83,51	55,01	21,45
Guaiacol	73,65	0,00	111,83	65,88	0,00	95,99	61,15	6,47	85,26	45,44	8,44	0,00	1,19
4-Ethylphenol	2,56	0,00	11,07	7,23	0,00	19,05	7,30	0,00	19,03	9,69	0,00	4,29	0,00
4-Methylguaiacol	0,49	0,53	0,35	0,62	0,68	0,37	4,00	3,90	0,95	4,14	0,00	0,00	0,00
5-Hydroxymethyl- furfural	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-Ethylguaiacol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,89	6,10	1,77	7,22	7,71	3,02	4,62
cis-Whiskylacton	5,98	8,60	4,39	12,50	14,45	4,85	14,61	16,06	4,86	11,28	12,86	4,62	2,27
5-Acetoxy-methyl- 2-furaldehyd	0,01	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	1,61	0,70	0,00	0,00	0,00
4-Vinylguaiacol	1571,12	1030,73	1879,87	2301,86	1063,96	2337,51	2050,20	1066,25	1797,00	2139,85	049,76	1881,34	12,91
trans-Whiskylacton	0,43	0,00	1,99	51,23	52,38	14,50	57,07	58,20	14,25	37,56	39,72	37,42	1,75
2,6-Dimethoxyphenol	38,88	15,95	45,22	44,95	16,65	49,60	54,06	35,36	40,99	57,81	40,10	16,67	0,00
Eugenol	12,26	12,32	0,65	15,23	15,14	1,30	15,67	15,62	1,28	16,81	16,67	0,00	0,00
4-Propylguaiacol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
β-Damascenon	20,78	25,97	20,99	19,54	14,26	21,73	20,00	14,20	22,55	19,90	14,40	22,62	13,28
Vanillin	3,69	0,00	11,79	6,86	0,00	15,23	18,26	13,69	14,66	22,33	17,67	3,37	18,33
Methyleugenol	0,00	0,00	0,00	1,49	0,00	3,35	1,52	0,00	3,41	1,47	0,00	0,00	29,92
Isoeugenol	1,35	0,00	3,65	3,76	0,46	5,82	17,76	21,31	8,30	35,17	40,09	18,33	92,68
γ-Nonalacton	13,77	0,00	26,00	11,38	0,00	25,47	19,57	0,00	30,53	19,16	0,00	0,00	0,00
Acetovanillon	245,43	271,82	97,05	279,95	291,97	85,79	291,89	315,60	85,66	290,51	301,47	92,68	0,00
δ-Decalacton	0,21	0,00	0,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)- acetone	29,48	33,78	16,11	41,88	41,87	15,48	68,06	64,22	14,80	93,98	94,14	38,26	40,89
Ethylvanillat	86,09	98,60	54,02	108,42	113,75	54,60	108,99	105,07	35,34	117,86	115,01	9,44	9,44
2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)- phenol	0,41	0,00	0,89	0,56	0,10	0,82	18,85	19,55	5,39	29,54	29,92	9,44	9,44
Syringaldehyd	13,79	0,00	30,33	141,87	158,02	64,47	1155,65	849,06	665,10	1331,45	1346,93	629,68	629,68

Tabelle 3.12: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Weine aus dem Sauerstoff/SO₂-Versuch.

3.24 zu beobachten, dass z. B. bei Furfurylalkohol die Konzentration nach der ersten Sauerstoffbehandlung steigt, um anschließend bei jedem weiteren Sauerstoffeintrag zu sinken. Ein ähnliches Verhalten zeigt auch 4-Methylguaiacol. Syringaaldehyd und Ethylvanillat nehmen bei den ersten Sauerstoffeinträgen noch zu, ab der Hälfte des Versuchs wird die Konzentration jedoch wieder geringer (siehe Abbildung 3.25). In der Literatur finden sich Angaben, dass nach einer Lagerung von Weinen mit Holzkontakt auf der Flasche die Konzentrationen von Furfurylalkohol und Syringaaldehyd ebenfalls abnahmen (Fernández de Simón et al. 2006). Die Konzentration von Acetovanillon nahm mit jeder Sauerstoffzugabe ab, dagegen blieb der Gehalt an Vanillin zunächst gleich, um bei den letzten drei Sauerstoffeinträgen anzusteigen. Cejudo-Bastante et al. (2011b) kamen in ihrer Studie zum gleichen Ergebnis.

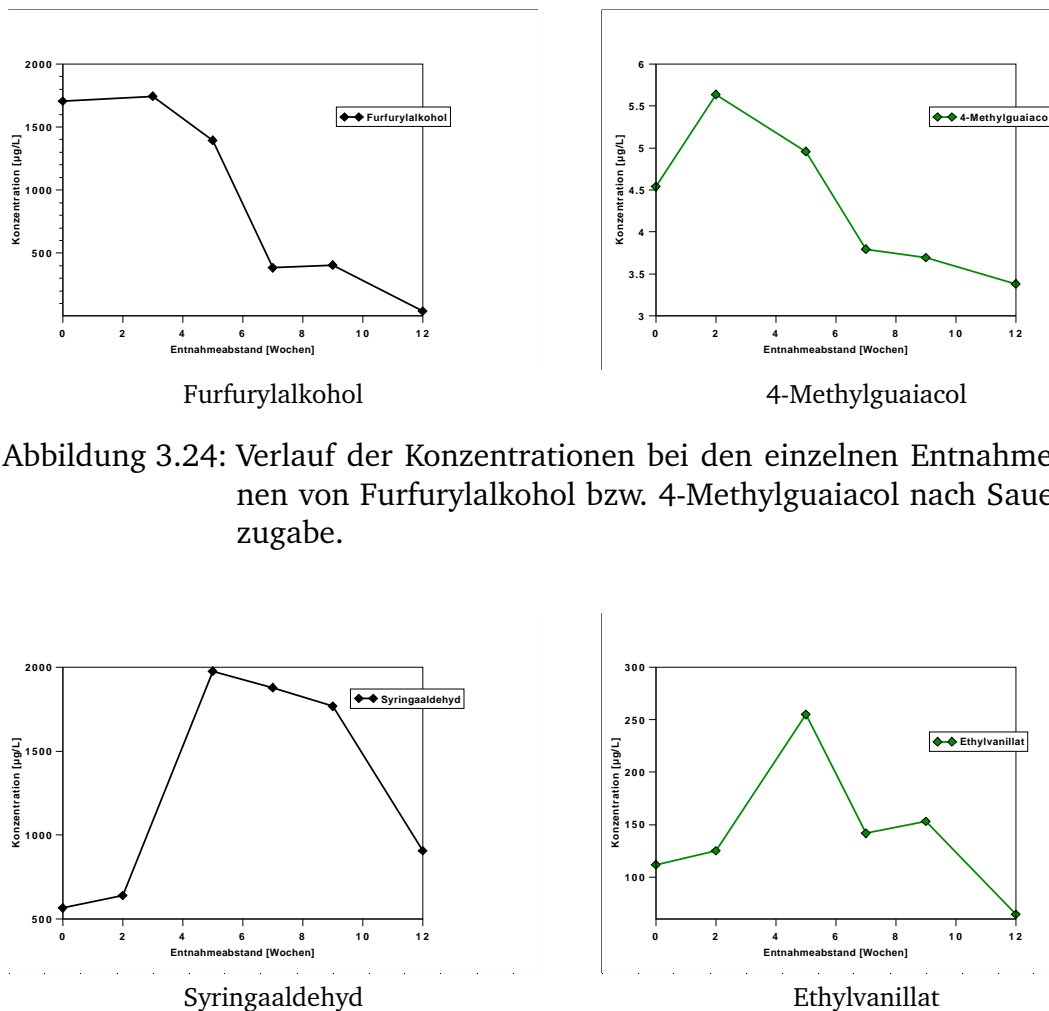


Abbildung 3.24: Verlauf der Konzentrationen bei den einzelnen Entnahmetermen von Furfurylalkohol bzw. 4-Methylguaiacol nach Sauerstoffzugabe.

Abbildung 3.25: Verlauf der Konzentrationen bei den einzelnen Entnahmetermen von Syringaaldehyd bzw. Ethylvanillat nach Sauerstoffzugabe.

Bei den meisten Verbindungen ist der Gehalt in den Proben ohne Sauerstoffeintrag höher als in den gleichen Proben mit Sauerstoffeintrag. In der Literatur finden sich ähnliche Angaben (Cejudo-Bastante et al. 2011a). Außerdem hat sich gezeigt, dass in den Proben, die ausreichend geschwefelt und mit Sauerstoff behandelt waren, die Gehalte an Holzinhaltsstoffen höher waren als in denen, die schwach geschwefelt waren. Interessant ist jedoch, dass bei den Proben ohne Sauerstoffeintrag die Konzentrationen an Holzinhaltsstoffen bei schwacher Schwefelung geringfügig höher lagen als bei den Proben, die ausreichend geschwefelt waren, also genau gegenteilig zu den vorher genannten Proben.

Neben der monovariaten Betrachtung der Ergebnisse wurden auch multivariate statistische Methoden eingesetzt. Hierfür wurde eine PLS Analyse durchgeführt um herauszufinden, ob der Sauerstoffeintrag oder die Schwefelung einen Einfluss auf die flüchtigen Komponenten aus den Eichenholzchips im Wein haben. Damit beide Versuchsparameter (Sauerstoffeintrag und Grad der Schwefelung) in die PLS Analyse gleichzeitig einfließen, wurde eine Y-Matrix mit zwei Spalten kreiert. In Tabelle 3.13 in der ersten Spalte (Y1) sind die Proben, die nicht mit Sauerstoff behandelt wurden, mit der numerischen Variablen 1, die Proben, die mit

Y1	Y2	Ansatz	Bedingung	Schwefelung
1	1	ohne Chips	ohne Sauerstoff	schwach geschwefelt
1	-1	ohne Chips	ohne Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
-1	1	ohne Chips	mit Sauerstoff	schwach geschwefelt
-1	-1	ohne Chips	mit Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
1	1	Chips leicht	ohne Sauerstoff	schwach geschwefelt
1	-1	Chips leicht	ohne Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
-1	1	Chips leicht	mit Sauerstoff	schwach geschwefelt
-1	-1	Chips leicht	mit Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
1	1	Chips medium	ohne Sauerstoff	schwach geschwefelt
1	-1	Chips medium	ohne Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
-1	1	Chips medium	mit Sauerstoff	schwach geschwefelt
-1	-1	Chips medium	mit Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
1	1	Chips stark	ohne Sauerstoff	schwach geschwefelt
1	-1	Chips stark	ohne Sauerstoff	ausreichend geschwefelt
-1	1	Chips stark	mit Sauerstoff	schwach geschwefelt
-1	-1	Chips stark	mit Sauerstoff	ausreichend geschwefelt

Tabelle 3.13: Übersicht der PLS-Codierung zur Prüfung des Einflusses von Sauerstoff und Schwefel auf das Profil der flüchtigen Stoffe im Holz. In Spalte Y1 steht die Codierung 1 für Weine ohne Sauerstoffzugabe und -1 für Weine mit Sauerstoffzugabe. Schwach geschwefelte Proben sind in Spalte Y2 mit 1 und ausreichend geschwefelte Proben mit -1 gekennzeichnet.

Sauerstoff behandelt wurden, mit der numerischen Variable -1 gekennzeichnet. In der zweiten Spalte (Y2) sind die Weine, die schwach geschwefelt wurden, mit der numerischen Variablen 1, die Weine, die ausreichend geschwefelt wurden, mit der numerischen Variablen -1 bezeichnet. Die PLS Analyse verwendet nun beide Y-Variablen zur Berechnung der Gruppen (Eriksson et al. 2001; Wold und Sjöström 1998).

Vor der Analyse wurden die Daten der Matrix transformiert, um größere Varianzunterschiede auszugleichen. Hierfür wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben zentriert, das heißt der Mittelwert (μ) der Stichprobe einer Variable wird von jedem einzelnen gemessenen Wert (X) abgezogen. Anschließend wird jeder einzelne zentrierte Wert standardisiert. Dafür werden die erhaltenen Werte durch die Standardabweichung (σ) der Stichprobe geteilt (siehe Gleichung 3.1). Durch dieses Verfahren der Standardisierung haben alle Werte eine Standardabweichung von 1 (Bro und Smilde 2003; van den Berg et al. 2006). Die so erhaltenen Werte werden in die PLS Analyse eingesetzt. Als maximale Faktorenzahl wurde 20 angegeben, der Algorithmus, der angewendet wurde, war NIPALS.

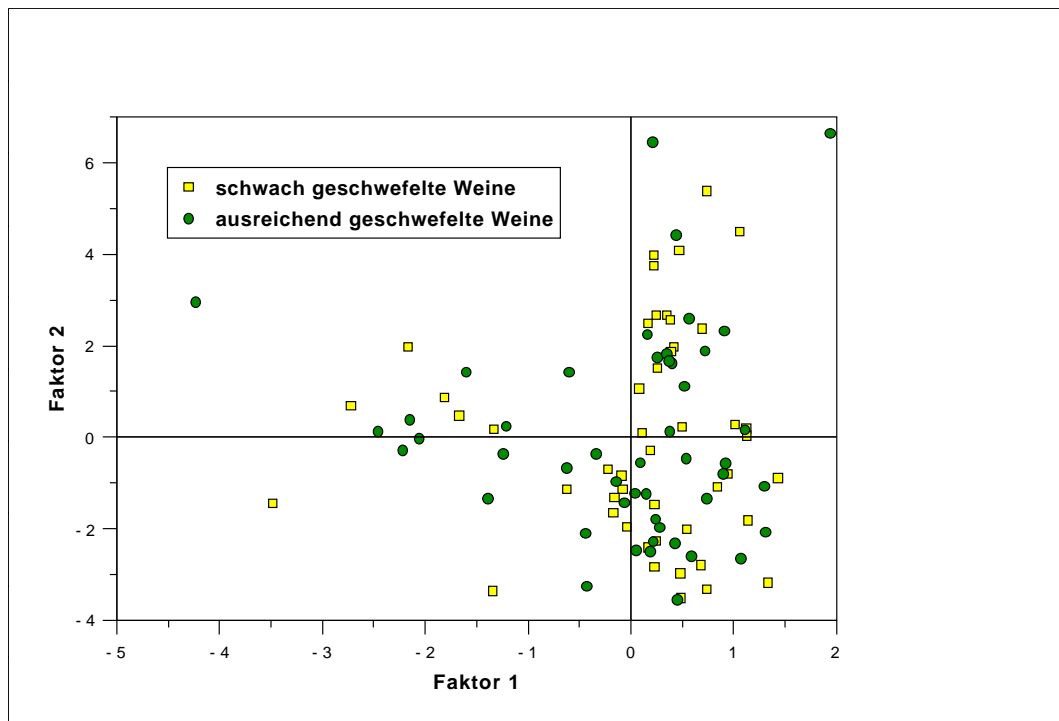


Abbildung 3.26: Scoresplot der PLS Analyse der Proben im SO₂-Versuch. Hervorgehoben ist die Probencodierung schwach bzw. ausreichend geschwefelt.

In Abbildung 3.26 ist der Scoresplot der PLS Analyse zu sehen, in welchem die Proben bezüglich der Schwefelung hervorgehoben sind. Hierbei zeigte sich, dass die Schwefelung keinen signifikanten Einfluss auf die flüchtigen Inhaltsstoffe, die aus den Eichenholzchips stammen, hat. Die Proben, die schwach geschwefelt wurden, sind nicht von den Weinen, die ausreichend geschwefelt wurden, zu unterscheiden. Es ist keine Gruppenbildung bezüglich der Schwefelung erkennbar.

Betrachtet man nun die gleiche Graphik, in der jedoch die Weine bezüglich des Sauerstoffeintrags hervorgehoben sind, so ist eine Trennung erkennbar (Abbildung 3.27). Die Trennung erfolgt hauptsächlich über die X-Achse bzw. Funktion 1. Allerdings überschneiden sich einige Proben. Es zeigt sich aber deutlich, dass der Sauerstoffeintrag einen größeren Einfluss auf die flüchtigen Verbindungen aus den Eichenholzchips hat als die Schwefelung.

Die flüchtigen Verbindungen, die den größten Einfluss auf die Trennung der Gruppen haben, sind Furfural und Ethylvanillat. Beide Komponenten laden hoch auf die erste Funktion, welche die meiste Information bezüglich der Trennung enthält. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass der Sauerstoffeintrag in der

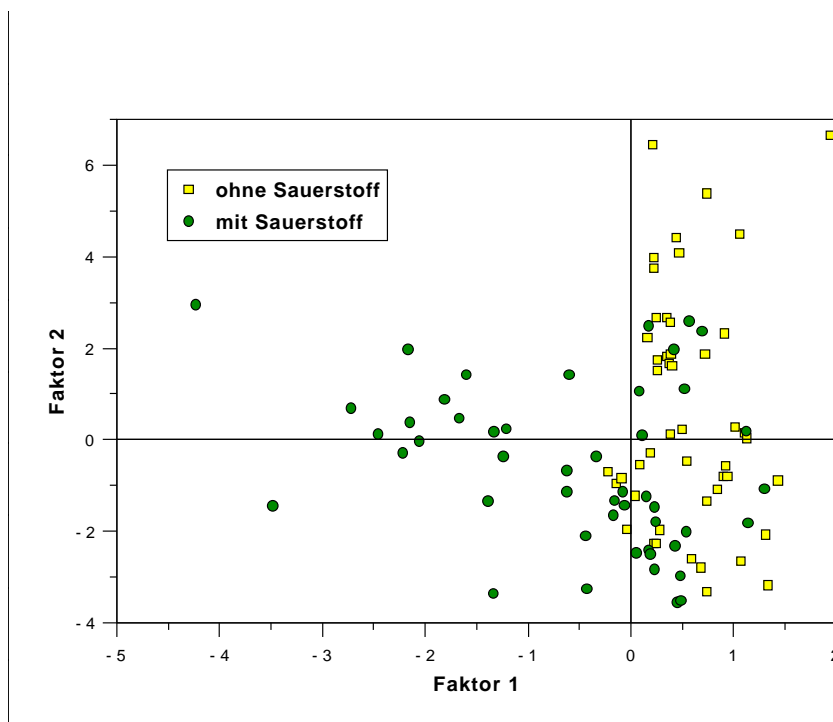


Abbildung 3.27: Scoresplot der PLS Analyse der Proben im SO_2 -Versuch. Aufgetragen sind die ersten beiden Faktoren der PLS Analyse. Hervorgehoben ist die Probencodierung ohne bzw. mit Sauerstoffbehandlung.

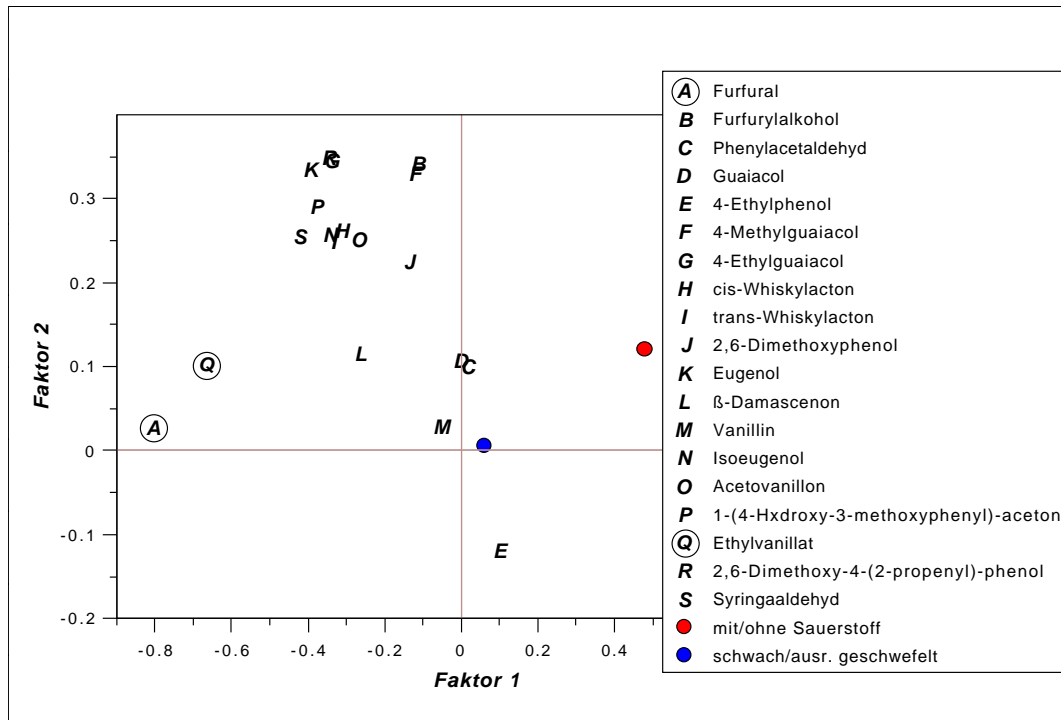


Abbildung 3.28: Loadingsplot der PLS Analyse der Proben im SO_2 -Versuch. Erkennbar ist das Verhalten der einzelnen gemessenen Variablen bezüglich der beiden ersten Faktoren der PLS Analyse. Die Variablen, die mit \bigcirc gekennzeichnet sind, sind die wichtigsten Variablen und tragen entscheidend zur Trennung der beiden Gruppen bei. Die mit \bullet gekennzeichnete Variable entspricht der Y-Variable "mit bzw. ohne Sauerstoffeintrag". Die mit \bullet gekennzeichnete Variable entspricht der Y-Variable "schwach bzw. ausreichend geschwefelt".

Weinbereitung eine entscheidende Rolle bezüglich der Einbindung der Holzaromen in den Wein hat. Gerade die Sauerstoffdurchlässigkeit von Eichenholzfässern spielt dabei eine große Rolle und wird im Ausbau mit Eichenholzchips durch Mikrooxygenierung nachgeahmt (Singleton 1987).

Der errechnete Loadingsplot der PLS Analyse (Abbildung 3.28) kann mit dem Scoresplot in Verbindung gebracht werden, da die gleichen Achsen verwendet werden. Variablen, die weit weg vom Ursprung bezüglich der ersten beiden Faktoren sind, erklären das Modell sehr gut. Verbindungen, die nahe dem Ursprung liegen, sind durch die aufgetragenen Faktoren schlecht erklärt und können in diesem Plot nicht interpretiert werden (Esbensen 2009). Hierbei wird nochmals deutlich, dass die Y-Variable Sauerstoffeintrag einen größeren Einfluss auf die flüchtigen Verbindungen aus den Eichenholzchips hat als die Variable Schwefelung. Denn die Sauerstoffvariable lädt deutlich höher auf Funktion 1 als die Schwefelungsvariable.

riable. In den Scoresplots kann man erkennen, dass die Trennung in zwei Gruppen bezüglich der X-Achse, also der Funktion 1 erfolgt. Die Variable Schwefelung liegt nah am Ursprung des Koordinatensystems, hat also insgesamt kaum Einfluss auf das Modell.

Bei einer weiteren PLS Analyse wurden die verschiedenen Toastungsgrade der verwendeten Eichenholzchips miteinbezogen. Dafür wurden die einzelnen Proben mit Y-Variablen bezogen auf die Toastungsart versehen. Die durchgeführte PLS Analyse zeigte, dass der Toastungsgrad der Eichenholzchips den größten Einfluss bezüglich der flüchtigen Inhaltsstoffe hat. Dies war zu erwarten, da hauptsächlich beim Rösten des Eichenholzes verschiedene flüchtige Verbindungen erst entstehen oder in ihrer Konzentration zunehmen (Cadahía et al. 2003; Fernández de Simón et al. 2010; Bozalongo et al. 2007; Koussissi et al. 2009).

In Abbildung 3.29 sind die einzelnen Proben bezogen auf den ersten und zweiten Faktor der PLS Analyse aufgetragen. Deutlich ist eine Trennung in vier Cluster zu erkennen, die die Weine einteilen, in die Gruppen „ohne Chips“, „leicht getoastete Chips“, „medium getoastete Chips“ und „stark getoastete Chips“. Die beiden Komponenten, die den größten Einfluss auf die Trennung haben, sind Furfural und Ethylvanillat, weil beide Verbindungen hoch auf die ersten beiden Faktoren laden.

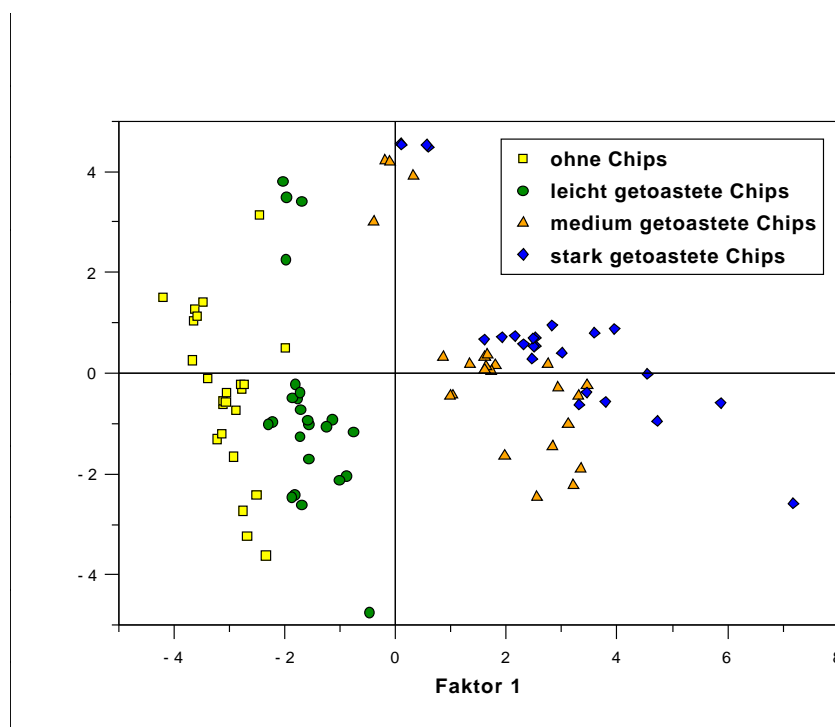


Abbildung 3.29: Scoresplot der PLS Analyse der Proben im SO₂-Versuch mit der Gruppenvariable "Toastungsgrad".

3.1.6 Untersuchung von Inhaltsstoffen in Extrakten von Eichenholzchips Modellweinen

Mit diesem Versuch sollten, zusätzlich zu den Aromastoffen aus getoastetem Eichenholz der bestehenden GC-MS Methode, weitere Holzaromastoffe in Modellweinen, die mit Eichenholzchips hergestellt wurden, nachgewiesen werden. Die bestehende Aufarbeitungsmethode mittels Festphasenextraktion wurde mit der Methode der flüssig/flüssig-Extraktion nach Kutscher-Steudel verglichen. Auch wurden Unterschiede in den Aromastoffkonzentrationen in Eichenholzchips verschiedener geographischer Herkunft (Deutsche Eiche, Französische Eiche und Amerikanische Eiche) untersucht (siehe Tabelle 3.14). Eine Überprüfung, welche Holzaromastoffe durch das Toasten der Eichenholzchips entstehen und welche Aromastoffe bereits im ungetoasteten Holz vorliegen, wurde durchgeführt. Der Einfluss von Sauerstoff und schwefeliger Säure auf das Profil bzw. die Konzentrationen bestimmter Holzinhaltstoffe wurde untersucht.

Versuchsvorbereitung

Es wurde je ein Liter Modellwein (siehe Kapitel 4.1.2) über 2 Wochen mit je 4 g/L Eichenholzchips hergestellt aus amerikanischer Eiche, medium getoastet (AM), französischer Eiche, medium getoastet (FM), deutscher Eiche, medium getoastet (DM) und deutscher Eiche, nicht getoastet (NT) (siehe Tabelle 3.14) versetzt. Nach dieser Zeit wurden die Eichenholzchips vom Wein abgezogen. Mit den amerikanischen Eichenholzchips wurden weitere drei Liter angesetzt und wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben behandelt.

Durchführung

Mit den Modellweinen, die mit den amerikanischen Eichenholzchips behandelt wurden, wurden die Versuche bezüglich Sauerstoff- und $K_2S_2O_5$ -Zusatz durchge-

Bezeichnung	Bedeutung	Hersteller
Oakyvin	medium getoastet, amerikanische Eiche (AM)	ERBSLÖH Geisenheim AG
Oakyvin	medium getoastet, französische Eiche(FM)	ERBSLÖH Geisenheim AG
Oakyvin	medium getoastet, deutsche Eiche(DM)	ERBSLÖH Geisenheim AG
Best Oak®	nicht getoastet (NT)	JRS J. Rettenmeier & Söhne GmbH + Co. KG

Tabelle 3.14: Verwendete Chipssorten für die Untersuchung von Modellweinextrakten

führt. Hierfür wurde je ein Liter des Modellweins mit amerikanischen Eichenholzchips zusätzlich, wie in der folgenden Aufzählung aufgeführt, behandelt.

- Referenzmodellwein ohne weitere Behandlung
- Zusatz von 200 mg/L $K_2S_2O_5$
- Sättigung mit Sauerstoff (über zwei Wochen jeden zweiten Tag in einem 2,5 L Behälter 30 Sekunden schütteln)
- Zusatz von 200 mg/L $K_2S_2O_5$ und Sättigung mit Sauerstoff (über zwei Wochen jeden zweiten Tag in einem 2,5 L Behälter 30 Sekunden schütteln)

Die drei Modellweinslösungen der Chipssorten AM, DM, FM und die zusätzlich önologisch behandelten AM Modellweine wurden mittels der SPE-Methode (siehe Kapitel 4.1.9) bzw. der flüssig/flüssig-Extraktion (Pentan/Dichlormethan-Extraktion) (siehe Kapitel 4.1.10) aufgearbeitet. Ziel der anschließenden GC-MS Messungen (siehe Kapitel 4.1.5 und 4.1.7 bzw. 4.1.8) war es, qualitativ neue, aus dem Holz extrahierte Substanzen zu detektieren.

Ergebnisse zur Detektion neuer Substanzen

Furoin

In den mit Pentan/Dichlormethan-Extraktion aufgearbeiteten Proben konnte bei einer Retentionszeit von 4,12 min ein Peak mit folgenden Hauptmassenfragmente detektiert werden: m/z 97, 95, 41, 39. Eine Recherche ergab, dass es sich hierbei um die Verbindung Furoin handelt (Becker und Beckert 2009; Beyer 1991). Diese Verbindung konnte nicht käuflich erworben werden und somit wurde keine Referenzmessung durchgeführt. Bei der Auswertung der Chromatogramme war auffällig, dass Furoin lediglich in den Pentan/Dichlormethan aufgearbeiteten Proben vorhanden war. Es wurde vermutet, dass diese Verbindung ein Artefakt in der Aufarbeitung darstellt. Dies wurde durch die Tatsache bestätigt, dass in allen SPE-aufgearbeiteten Proben kein Furoin, sondern nur Furfural (500 - 800 $\mu\text{g/L}$) vorlag. In den Pentan/Dichlormethan aufgearbeiteten Proben jedoch war Furoin stets als deutlich sichtbarer Peak erkennbar (1800 - 5500 $\mu\text{g/L}$), Furfural dagegen war hier kaum noch detektierbar (0 - 2 $\mu\text{g/L}$). Eine Dimerisierung von Furfural zu Furoin ist demnach wahrscheinlich. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die Bildung von Furoin aus Furfural in einem Experiment überprüft.

Hierfür wurden 2,0 mg Furfural analog der Pentan/Dichlormethan-Extraktion aus Kapitel 4.1.10 in 100 mL Lösungsmittelgemisch (Pentan:Dichlormethan = 4:1)

aufgearbeitet, eingengt und über Natriumsulfat getrocknet. Die anschließend erfolgte GC-MS Messung zeigte, dass nur geringe Mengen Furfural vorlagen und es sich bei dem Hauptpeak, bei einer Retentionszeit von 4,12 min, laut der Spektrendatenbank um Furoin handelt. Somit scheint das gefundene Furoin ein Artefakt der Pentan/Dichlormethan Aufarbeitung zu sein.

2,4-Bis(*t*-butyl)phenol

Im GC-MS Spektrum zeigte sich bei einer Retentionszeit von 24,57 min und Hauptmassenfragmenten von $m/z = 191$, 41 und 206 ein neuer Substanzpeak, bei dem es sich laut der Spektrendatenbank um 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol handelt. Ein Referenzlauf war nicht möglich, da die Substanz nicht käuflich erworben wurde. Eine Literaturrecherche ergab, dass es sich bei 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol nicht um eine Holzkomponente handelt. Vielmehr wird 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol mit dem Stabilisator Irgafos 168 in Polyethylen in Verbindung gebracht. Bei Irgafos 168 handelt es sich um Tris(2,4-di-*t*-butyl)phosphit, das im Schmelzprozess von Polyethylen eingesetzt wird. Dabei zerstört der Stabilisator unerwünschte Hydroperoxide und generiert ein Phosphat und einen Alkohol (siehe Abbildung 3.30) (Billingham und Garcia-Trabajo 2001; Gächter und Müller 1990). Der Stabilisator Tris(2,4-di-*t*-

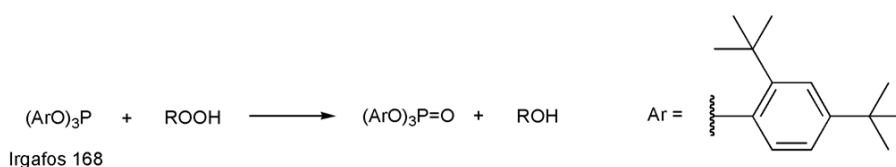


Abbildung 3.30: Reaktionsgleichung zum Abbau von 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol

butyl)phosphit hat die Tendenz, unerwünschte Hydrolysereaktionen einzugehen. Eine vollständige Hydrolyse ergibt dabei drei Äquivalente 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol (siehe Abbildung 3.31), welches in Polymeren viel besser löslich ist als der ursprüngliche Zusatzstoff Irgafos 168 selbst (Billingham und Garcia-Trabajo 2001; Gächter und Müller 1990).

Daher ist es wahrscheinlich, dass 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol nicht aus dem Modellwein extrahiert wurde, sondern aus Polyethylen. Die bei der Aufarbeitung verwendeten Festphasenkartuschen LiChrolut EN der Firma Merck sowie die eingesetzten Aufsatzkartuschen und Plastiktrichter bestehen aus Polyethylen. Diese These wurde überprüft, indem eine Festphasenkartusche mit einer Aufsatzkartusche entsprechend zur SPE-Aufarbeitung aus Kapitel 4.1.9 vorbereitet wurde und anschließend

die Kartuschen zweimal mit je 0,5 mL Dichlormethan beschickt und das Lösungsmittel in ein GC-Vial geleitet wurden. Der GC-MS-Lauf bestätigte die Vermutung, denn im analysenreinen Lösungsmittel wurden 0,563 mg/L 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol aus dem Polyethylen detektiert.

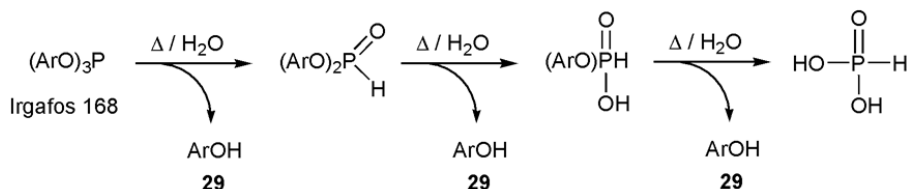


Abbildung 3.31: Entstehung von drei Äquivalenten 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol

Desaspidinol

Der Peak, der bei einer Retentionszeit von 30,63 min gemessen wurde, konnte anhand der Spektrendatenbank als Desaspidinol (siehe Abbildung 3.32) mit den Hauptfragmenten bei $m/z = 167, 210, 168$ identifiziert werden.

Desaspidinol wurde bereits von Buttica und Rawlyer (2007) als Holzkomponente

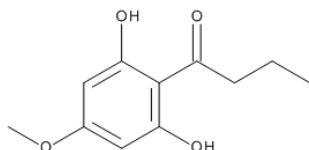


Abbildung 3.32: Desaspidinol

in Weinen analytisch nachgewiesen. In der Literatur wird diese aromatische Verbindung als Farninhaltsstoff beschrieben (Büchi et al. 1957; Socolsky et al. 2003; Aebi et al. 1957). Da diese Verbindung nicht kommerziell erworben wurde, wurde kein Referenzlauf durchgeführt.

Ergebnisse zum Vergleich Festphasen-Extraktion mit flüssig/flüssig-Extraktion

Bei dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob mit einer flüssig/flüssig-Extraktion (siehe Kapitel 4.1.10) mit einem Lösungsmittelgemisch aus Pentan und Dichlormethan (4:1) höhere Konzentrationen an Aromastoffen erzielt werden können als mit der SPE Aufarbeitungsmethode (siehe Kapitel 4.1.9). Bei der flüssig/flüssig-Extraktion findet eine Anreicherung um das 250-fache statt. Der Anreicherungsgrad der SPE-Aufarbeitung beträgt nur das 50-fache.

Die Modellweinextrakte mit den Eichenholzchips DM, FM und AM wurden jeweils mit SPE- und mit der flüssig/flüssig-Extraktion aufgearbeitet und mittels GC-MS analysiert. In Tabelle 3.15 sind die halbquantitativen Messwerte zusammengefasst.

Substanz	DM SPE [mg/L]	Pentan/Dichlor- methan [mg/L]	FM SPE [mg/L]	Pentan/Dichlor- methan [mg/L]	AM SPE [mg/L]	Pentan/Dichlor- methan [mg/L]
Furoin	0,000	3,078	0,000	5,482	0,000	1,783
Furfural	0,482	0,002	0,790	0,002	0,652	0,631
5-Methylfurfural	0,197	0,746	0,284	0,736	0,562	0,631
Guaiacol	0,000	0,026	0,000	0,035	0,047	0,055
4-Methylguaiacol	0,000	0,000	0,000	0,158	0,000	0,000
4-Ethylguaiacol	0,000	0,017	0,000	0,012	0,060	0,000
<i>trans</i> -Whiskylacton	0,121	0,168	0,027	0,038	0,127	0,117
5-Acetoxymethyl- 2-furaldehyd	0,000	0,000	0,000	0,034	0,148	0,105
<i>cis</i> -Whiskylacton	0,147	0,189	0,117	0,148	0,761	0,685
2,6-Dimethoxyphenol	0,000	0,024	0,058	0,082	0,185	0,137
Eugenol	0,026	0,067	0,050	0,070	0,077	0,077
Vanillin	1,575	0,492	2,107	1,038	2,424	0,895
Isoeugenol	0,038	0,028	0,051	0,059	0,192	0,129
Acetovanillon	0,037	0,017	0,149	0,061	0,235	0,067
Methoxyeugenol	0,053	0,030	0,120	0,095	0,172	0,139
Syringaaldehyd	3,113	0,126	5,525	1,051	5,991	0,644
Coniferaldehyd	5,832	0,618	3,864	0,913	8,700	0,943
Desaspidinol	0,034	0,105	0,713	0,176	1,074	0,132
Sinapaldehyd	4,553	0,163	5,322	1,145	10,941	0,981

Tabelle 3.15: Vergleich der Festphasen- mit Pentan/Dichlormethan-Extraktion anhand der Modellweine AM, FM und DM

Die Analyse der flüssig/flüssig-Extrakte ergab, dass Furoin in größeren Mengen (1,783 - 5,482 mg/L), Furfural hingegen nur in Spuren (0,00 - 2,00 mg/L) vorkommt. Dagegen war in den SPE Extrakten eine erhebliche Menge Furfural zu finden (0,48 - 0,80 mg/L). Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass es sich bei Furoin um ein Dimerisierungsprodukt handelt.

Weiterhin ist auffallend, dass die Substanzen mit einer Retentionszeit von weniger als 20,72 min (5-Methylfurfural, Guaiacol, 4-Methylguaiacol, *trans*-Whiskylacton, 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd, *cis*-Whiskylacton, 2,6-Dimethoxyphenol und Eugenol) in den Pentan/Dichlormethan-Extrakten höher konzentriert sind als in den SPE-aufgearbeiteten Proben; Verbindungen mit einer höheren Retentionszeit (Vanillin, Isoeugenol, Acetovanillon, Methoxyeugenol, Syringaaldehyd, Coniferaldehyd, Desaspidinol, Sinapaldehyd) dagegen können nach Festphasenextraktion in höheren Konzentrationen detektiert werden.

Die geringere Konzentration der Verbindungen 5-Methylfurfural, Guaiacol, 4-Methylguaiacol, 4-Ethylguaiacol, *trans*-Whiskylacton, 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd,

cis-Whiskylacton, 2,6-Dimethoxyphenol und Eugenol nach der SPE-Aufarbeitung ist höchstwahrscheinlich auf die Verwendung von Festphasenkartuschen mit Styrol-Divinyl-Benzol-Phasen zurückzuführen. Bei den aufgeführten Stoffen handelt es sich um kleine Moleküle mit relativ wenigen π -Elektronen, die nur wenig mit dem Sorbens in Wechselwirkung treten können und daher nur in geringem Maße extrahiert werden. Die Holzkomponenten Vanillin, Isoeugenol, Acetovanillon, Methoxyeugenol, Syringaaldehyd, Coniferaldehyd, Desaspidinol und Sinapaldehyd dagegen weisen ein höheres Molekulargewicht auf und besitzen alle ein Syringyl- bzw. Guaiacyl-Grundgerüst. Daher können diese aromatischen Systeme vermehrt mit der ebenfalls π -elektronenreichen Festphase wechselwirken und werden in höheren Konzentrationen aus der Modellweidlösung extrahiert.

Die Wärmeeinwirkung bei der flüssig/flüssig-Extraktion muss außerdem berücksichtigt werden. Bei höheren Temperaturen kann es vermehrt zur Bildung von Furfuralen kommen, welche über Maillardreaktionen mit gelösten Sacchariden im Wein bzw. durch direkte Zuckerpyrolyse entstehen (Fernández de Simón et al. 2009; Mosedale und Puech 1998; Cutzach et al. 1997; Ortega-Heras et al. 2004).

Weiterhin ist nachgewiesen, dass bei der SPE-Aufarbeitung, die bei Raumtemperatur durchgeführt wird, Stoffe der Syringyl-Serie in höheren Konzentrationen auftreten als die der Guaiacyl-Serie. Bei Hitzeeinwirkung werden vermehrt Guaiacyl-Derivate gebildet, der Gehalt an Syringol-Derivaten sinkt (Mosedale und Puech 1998).

Um den Abbau von Syringyl- zu Guaiacylstrukturen durch Hitzeeinwirkung zu bestätigen, können die Konzentrationen von Syringol-Derivaten mit den Konzentrationen der ansonsten konstitutionell identischen Guaiacol-Derivaten verglichen werden. Hierfür werden als Beispiel Vanillin und Syringaaldehyd, sowie Coniferaldehyd und Sinapaldehyd verwendet. Vanillin und Coniferaldehyd dienen dabei als Vertreter der Guaiacyl-Serie und Syringaaldehyd und Sinapaldehyd als Vertreter der Syringyl-Serie. In Tabelle 3.16 sind die Konzentrationen von Vanillin und Syringaaldehyd, sowie von Coniferaldehyd und Sinapaldehyd in den verschiedenen Proben ins Verhältnis gesetzt. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Pentan/Dichlormethan-Extrakte stets einen höheren Wert liefern als die SPE-aufgearbeiteten Proben. Demzufolge werden wie vermutet die Konzentrationen an Guaiacol-Derivaten unter Hitzeeinwirkung erhöht. Unter Berücksichtigung all dieser Beobachtungen ist die SPE-Aufarbeitung der flüssig/flüssig-Extraktion vorzuziehen, da diese nicht nur weniger zeitintensiv ist, sondern auch keine (Zerstellungs-)Reaktionen fördert. Außerdem liefert die Festphasen-Aufarbeitung vor

Syringyl/ Guaiacyl-Verhältnis	DM SPE	Pentan/Dichlor- methan	FM SPE	Pentan/Dichlor- methan	AM SPE	Pentan/Dichlor- methan
$\frac{c[\text{Vanillin}]}{c[\text{Syringaldehyd}]}$	0,506	3,905	0,381	0,988	0,405	1,390
$\frac{c[\text{Coniferaldehyd}]}{c[\text{Sinapaldehyd}]}$	1,281	3,791	0,726	0,797	0,795	0,961

Tabelle 3.16: Verhältnis von ansonsten strukturgleichen Syringyl- zu Guaiacylderivaten nach Festphasen- und Pentan/Dichlormethan-Extraktion

allem für Substanzen ab einer Retentionszeit von 20,72 min vermehrt bessere Ausbeuten ($> 1,00 \text{ mg/L}$).

Vergleich von Eichenholzchips deutscher, französischer und amerikanischer Herkunft

Die Konzentration verschiedener Holzaromastoffe im Wein ist erheblich abhängig von der geographischen Herkunft des Holzes (Cadahía et al. 2003). So wird zum Beispiel die amerikanische Eiche bezogen auf europäische Eichenarten als aromatischer eingestuft (Steidl und Leindl 2001). Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurden Modellweine jeweils mit medium getoasteten Eichenholzchips amerikanischer (AM), französischer (FM) und deutscher (DM) Herkunft versetzt und anschließend auf flüchtige Inhaltsstoffe untersucht. In Tabelle 3.17 sind die Ergebnisse der GC-MS Messungen nach einer Aromastoffanreicherung mittels SPE zusammengefasst.

Die Modellweinlösung mit den amerikanischen Eichenholzchips zeigte in fast allen Fällen übereinstimmend mit der Literatur (Steidl und Leindl 2001) die höchsten Konzentrationen an, außer den Verbindungen Furfural und 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol, die die höchsten Konzentrationen in der Probe mit den französischen Eichenholzchips erreichen. Bei 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol handelt es sich wie zuvor aufgeführt nicht um einen Holzinhaltsstoff, sondern um eine aus Polyethylen extrahierte Substanz.

Aufgrund der gemessenen Daten können die französischen Eichenholzchips als aromareicher als die deutschen Eichenholzchips eingestuft werden. Die Konzentrationen der meisten flüchtigen Holzinhaltsstoffe in den Modellweinlösungen mit französischen Chips liegen höher als in den Lösungen mit deutschen Chips. Lediglich die Verbindungen *cis*- und *trans*-Whiskylacton sowie Coniferaldehyd wiesen

Substanz	DM SPE [mg/L]	FM SPE [mg/L]	AM SPE [mg/L]
Furfural	0,482	0,790	0,652
5-Methylfurfural	0,197	0,284	0,562
Guaiacol	0,000	0,000	0,047
4-Ethylguaiacol	0,000	0,000	0,060
<i>trans</i> -Whiskylacton	0,121	0,027	0,127
5-Acetoxymethyl- 2-furaldehyd	0,000	0,000	0,148
<i>cis</i> -Whiskylacton	0,147	0,117	0,761
2,6-Dimethoxyphenol	0,000	0,058	0,185
Eugenol	0,026	0,050	0,077
Vanillin	1,575	2,107	2,424
Isoeugenol	0,038	0,051	0,192
Acetovanillon	0,037	0,149	0,235
2,4-Bis(<i>t</i> -butyl) phenol (Artefakt)	0,000	0,160	0,023
Methoxyeugenol	0,053	0,120	0,172
HMPA	0,090	0,482	0,733
Homovanillinsäure	0,212	0,080	0,625
Syringaaldehyd	3,113	5,525	5,991
Coniferaldehyd	5,832	3,864	8,700
Desaspidinol	0,034	0,713	1,074
Acetosyringon	0,089	0,436	0,919
Sinapaldehyd	4,553	5,322	10,941

Tabelle 3.17: Vergleich der Konzentrationen ausgewählter flüchtiger Verbindungen der Modellweinlösungen DM (Eichenholzchips deutscher Herkunft), FM (Eichenholzchips französischer Herkunft) und AM (Eichenholzchips amerikanischer Herkunft) nach SPE Aufarbeitung.

höhere Konzentrationen in den deutschen Eichenholzchips auf. Das Verhältnis der beiden Lactone *trans*- bzw. *cis*-Whiskylacton kann als Merkmal für den geographischen Ursprung des Eichenholzes angenommen werden. So erwartet man bei der amerikanischen Weißeiche (*Quercus alba*) einen Wert zwischen 5 und 8. Die in Europa heimische Traubeneiche (*Quercus petraea*) soll annähernd den gleichen Wert wie die amerikanische Eiche aufweisen. Dagegen wird für die ebenfalls in Europa angebaute Stieleiche (*Quercus robur*) ein Wert von 1-1,5 angenommen (Mosedale und Puech 1998; Mosedale und Savill 1996; Herjavec et al. 2007).

Die Verhältnisse der Konzentrationen der Isomere des Whiskylactons, die in den verschiedenen Proben bestimmt wurden, sind in Tabelle 3.18 zusammengefasst. Der Wert, der für die amerikanischen Eichenholzchips berechnet wurde, betrug 5,99. Dieses Ergebnis liegt in dem Bereich, der für *Quercus alba* zu erwarten war. Die Modellweinlösung mit den deutschen Eichenholzchips ergab einen Wert von

Whiskylactonverhältnis	DM	FM	AM
$\frac{c[\textit{trans-Whiskylacton}]}{c[\textit{cis-Whiskylacton}]}$	1,22	4,33	5,99

Tabelle 3.18: Verhältnis der beiden Lactone *trans*- bzw. *cis*-Whiskylacton in den Modellweinen DM (Eichenholzchips deutscher Herkunft), FM (Eichenholzchips französischer Herkunft) und AM (Eichenholzchips amerikanischer Herkunft).

1,22. Dieser Wert spricht für eine Verwendung von *Quercus robur*. Der Wert von 4,33 der Modellweinolösung mit den französischen Eichenholzchips liegt relativ nahe am Wert für die amerikanische Weißeiche. Dies deutet darauf hin, dass die französischen Eichenholzchips aus *Quercus petraea* hergestellt worden sind.

Welche Sorte an Eichenholzchips eingesetzt wird, bleibt jedoch jedem Winzer selbst überlassen. Es ist aber anzumerken, dass die amerikanischen Eichenholzchips, die ohnehin schon aromareicher sind, besonders erhöhte Gehalte an den bevorzugten Verbindungen wie 5-Methylfurfural, Vanillin, *cis*-Whiskylacton, Syringaaldehyd und Guaiacol enthalten.

Unterschiede zwischen getoasteten und nicht getoasteten Eichenholzchips

Es wurden auch Untersuchungen an einem Modellwein mit ungetoasteten Eichenholzchips (NT) durchgeführt. Die GC-MS Messungen sollten Aufschluss darüber geben, welche Holzaromastoffe originär, also im unbehandelten bzw. nicht getoasteten Eichenholz vorkommen und welche Verbindungen erst durch die Erhitzung entstehen. Die Konzentrationen in den Modellweinolösungen AM (amerikanische Eiche medium getoastet) und NT (amerikanische Eiche nicht getoastet) nach SPE Aufarbeitung sind in Tabelle 3.19 zusammengefasst.

Wie zu erwarten war, enthält die Probe mit den nicht getoasteten Chips (NT) entsprechend zur Literatur (Doussot et al. 2002) weniger flüchtige Verbindungen als die Modellweinolösung mit medium getoasteten Chips (AM). Es konnten lediglich acht Komponenten in der NT Probe detektiert werden. Dies waren *cis*-Whiskylacton, Eugenol, 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol, Homovanillinsäure, Syringaaldehyd, Desaspidinol, Acetosyringon und Sinapaldehyd. In der Modellweinolösung mit den medium getoasteten Chips konnten alle 21 Verbindungen aus Tabelle 3.19 gemessen werden. Die Konzentration der Stoffe, die in der NT Probe gemessen wurden, lagen deutlich unter den Konzentrationen der AM Probe. Es zeigte sich außer-

Substanz	AM [mg/l]	NT [mg/l]
Furfural	0,652	0,000
5-Methylfurfural	0,562	0,000
Guaiacol	0,047	0,000
4-Ethylguaiacol	0,060	0,000
<i>trans</i> -Whiskylacton	0,127	0,000
5-Acetoxymethyl- 2-furaldehyd	0,148	0,000
<i>cis</i> -Whiskylacton	0,761	0,109
2,6-Dimethoxyphenol	0,185	0,000
Eugenol	0,077	0,024
Vanillin	2,424	0,000
Isoeugenol	0,192	0,000
Acetovanillon	0,235	0,000
2,4-Bis(<i>t</i> -butyl) phenol (Artefakt)	0,023	0,023
Methoxyeugenol	0,172	0,000
HMPA	0,733	0,000
Homovanillinsäure	0,625	0,068
Syringaaldehyd	5,991	0,209
Coniferaldehyd	8,700	0,000
Desaspidinol	1,074	0,031
Acetosyringon	0,919	0,057
Sinapaldehyd	10,941	0,061

Tabelle 3.19: Vergleich der Modellweinlösungen mit medium getoasteten (AM) und ungetoasteten (NT) amerikanischen Eichenholzchips nach SPE Aufarbeitung

dem, dass nur das *cis*-Isomer des Whiskylactons in ungetoastetem Eichenholz in nachweisbaren Konzentrationen vorliegt. *Trans*-Whiskylacton, sowie weitere Mengen *cis*-Whiskylacton werden offenbar erst durch die Erhitzung des Holzes gebildet (Mosedale und Puech 1998).

Einfluss von Sauerstoff und Kaliumpyrosulfit auf das Aromaprofil

Beim Ausbau von Weinen ist die Redoxführung ein wichtiger Bestandteil. Dabei dient Luftsauerstoff als Oxidationsmittel und Kaliumpyrosulfit ($K_2S_2O_5$) als Reduktionsmittel. Während der Lagerung im Eichenfass kann Sauerstoff durch das Holz diffundieren, aber auch während der einzelnen Produktionsschritte kann Sauerstoff in den Wein gelangen. Es können dabei bis zu 7 mg Sauerstoff in einen Liter Wein aufgenommen werden. In diesem Zusammenhang kann Sauerstoff im Grundzustand (3O_2) Oxidationsprozesse katalysieren oder auch in aktivierte Spezies, wie z. B. Singulett-Sauerstoff (1O_2), Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid

(H_2O_2) etc., verwandelt werden und damit zu weiteren Folgereaktionen führen. Kaliumpyrosulfit wirkt sich außerdem antimikrobiell auf den Wein aus und verhindert die Verbreitung von unerwünschten Hefen und Bakterien. Unerwünschte Kettenreaktionen, die durch Luftsauerstoff ausgelöst werden können, werden durch Kaliumpyrosulfit als Reduktionsmittel gestoppt (Clarke und Bakker 2004).

Um den Einfluss dieser önologischen Behandlungsmittel auf den Wein untersuchen zu können, wurden Modellweine mit medium getoasteten Eichenholzchips aus amerikanischer Eiche auf verschiedene Weise mit Sauerstoff und schwefeliger Säure behandelt. Eine Probe wurde mit 200 mg/L Kaliumpyrosulfit versetzt, eine zweite Probe ebenfalls mit 200 mg/L Kaliumpyrosulfit und über 2 Wochen mit Sauerstoff gesättigt. Eine dritte Probe wurde über 2 Wochen mit Sauerstoff gesättigt.

Aufgearbeitet wurden diese Proben mittels SPE, wobei der Einfluss des Oxidationsmittels Sauerstoff und des Reduktionsmittels Kaliumpyrosulfit auf die flüchti-

Substanz	AM, SPE-Aufarbeitung		
	$K_2S_2O_5$ [mg/L]	$K_2S_2O_5 + O_2$ [mg/L]	O_2 [mg/L]
Furfural	0,270	0,184	0,366
5-Methylfurfural	0,464	0,289	0,374
Guaiacol	0,054	0,045	0,035
4-Ethylguaiacol	0,000	0,044	0,049
<i>trans</i> -Whiskylacton	0,182	0,161	0,108
5-Acetoxymethyl- 2-furaldehyd	0,000	0,000	0,124
<i>cis</i> -Whiskylacton	1,092	1,105	0,591
2,6-Dimethoxyphenol	0,329	0,388	0,143
Eugenol	0,119	0,134	0,075
Vanillin	1,932	1,330	1,893
Isoeugenol	0,134	0,056	0,095
Acetovanillon	0,208	0,160	0,175
2,4-Bis(<i>t</i> -butyl) phenol (Artefakt)	0,000	0,026	0,020
Methoxyeugenol	0,218	0,183	0,156
HMPA	0,920	0,609	0,575
Homovanillinsäure	0,000	0,000	0,183
Syringaaldehyd	0,913	0,091	0,545
Coniferaldehyd	7,914	4,229	6,157
Desaspidinol	1,161	0,655	0,678
Acetosyringon	0,668	0,577	0,402
Sinapaldehyd	8,454	3,960	7,145

Tabelle 3.20: Vergleich der Aromastoffkonzentration nach unterschiedlicher önologischer Behandlung nach SPE Aufarbeitung

gen Holzinhaltsstoffe des Weins untersucht wurde. Die Messergebnisse der GC-MS Analysen sind in Tabelle 3.20 zusammengefasst.

Durch den Zusatz von Sauerstoff oder Kaliumpyrosulfit konnte keine neu entstandene Substanz nachgewiesen werden. Tabelle 3.20 zeigt, dass die Konzentrationen fast aller Aromastoffe in der O_2 -Probe höher liegen als in der $K_2S_2O_5$ -Probe. Ausnahmen sind hierbei die Verbindungen Furfural, 4-Ethylguaiacol, 2,4-Bis(*t*-butyl)phenol und Homovanillinsäure. Die Verbindung Homovanillinsäure ist ein Oxidationsprodukt, dessen Bildung durch den Luftsauerstoff katalysiert wird. Da diese Komponente weder in der $K_2S_2O_5$ -Probe noch in der $K_2S_2O_5 + O_2$ -Probe detektiert wurde, scheint Kaliumpyrosulfit diese Reaktion komplett zu unterdrücken.

3.2 HPLC und Photometrische Analytik

Begleitend zu der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen eines Projektes eine Masterarbeit durchgeführt und betreut, bei der die Analytik der Polyphenole optimiert wurde (Vogel 2010).

Um die Analytik von Weinen mit Holzkontakt zu erweitern, wurde an einem HPLC-DAD Gerät im Rahmen einer Diplomarbeit eine Methode zur Polyphenolanalytik entwickelt. Hierfür wurde der Fokus zunächst auf die Aufarbeitung der Proben gelegt. Es hat sich gezeigt, dass eine Aufkonzentrierung der Proben essentiell ist, da die Gehalte der zu analysierenden Inhaltsstoffe im Wein relativ niedrig liegen. Anschließend wurden der Gradient und die Fließmittel optimiert und ausgewählte Substanzen kalibriert. Mit dieser Methode wurden verschiedene authentische Weine und Weine aus dem Handel untersucht. Dieselben Weine wurden einer Farbmessung mittels eines Photometers unterzogen. Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der Schwerpunkt auf die Klassifizierung der Trennung der authentischen Proben in die Gruppen Chips und Barrique und der Klassifizierung von unbekannten Proben gelegt.

3.2.1 HPLC Methodenentwicklung

Die Entwicklung der HPLC-Trennmethode wurde an die Arbeiten von Del Álamo Sanza et al. (2004b) und Peña-Neira et al. (2000) angelehnt und mit einem Gradienten aus Acetonitril, Essigsäure und Wasser aufgebaut. Es hat sich jedoch nach kurzer Zeit ein Acetonitrilmangel auf dem Markt eingestellt. Aus diesem Grund wurde die Methode auf einen Gradienten aus einem Phosphatpuffer (siehe Kapitel 4.2.2) und Methanol geändert. Methanol wurde gewählt, da es ähnlich polar ist wie Acetonitril. Bei der Verwendung eines Puffers ist der pH-Wert wesentlich stabiler und somit die Reproduzierbarkeit besser gewährleistet. Es wurde mit einem Gradienten gearbeitet, um die Dauer der einzelnen Läufe relativ gering zu halten und alle Substanzen gut eluieren zu können. Mit Hilfe von eingebauten Plateaus war es möglich, eine saubere Trennung der Substanzen zu erreichen. Es wurde außerdem ein Spülvorgang mit 90% Methanol am Ende jeden Laufs integriert, um alle restlichen Substanzen von der Säule zu lösen. Anschließend wurde die Methanolkonzentration heruntergefahren, um die Säule für den nächsten Lauf zu konditionieren (siehe Kapitel 4.2.4).

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu erhöhen, wurde ein interner Standard verwendet, der vor der Aufarbeitung in einer bekannten Konzentration zu jeder

Probe hinzugefügt wurde. Bei der Quantifizierung der einzelnen Substanzen wurde die Fläche des internen Standards mit eingerechnet. Es wurden verschiedene Substanzen getestet, die ähnliches Verhalten und ähnliche Struktur wie die Reinsubstanzen aufweisen, jedoch nicht natürlich in Weinen mit Holzkontakt vorkommen und die nicht mit den zu untersuchenden Substanzen überlagern. Schließlich fiel die Wahl auf die Verbindung 4-Methoxybenzoesäure (Abbildung 3.33), die diese Kriterien erfüllt (Koseki et al. 1996). Diese Substanz hat ihr Maximum bei einer Wellenlänge von 257 nm und wird bei einer Retentionszeit von 45,70 min detektiert. Zwar besitzt die Substanz Coniferaldehyd eine ähnliche Retentionszeit wie 4-Methoxybenzoesäure, allerdings haben beide Substanzen ihr Maximum bei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Konzentrationen an phenolischen Verbindun-

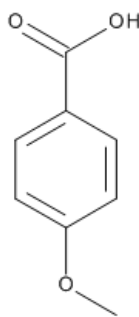


Abbildung 3.33: Interner Standard: 4-Methoxybenzoesäure

gen in Wein sind für eine Direkteinspritzung zu niedrig. Dies zeigte sich an den Peakhöhen der Reinsubstanzen, die in den Standardmixlösungen zu niedrig für die Integration waren. Daher wurde auf die Methode der Festphasenextraktion zurückgegriffen. Es wurden verschiedene Phasen der Firma Macherey-Nagel getestet, um die für diese Problemstellung am besten geeignete Phase zu erhalten. Es wurden die Chromabond® RP-Säulen Easy, HR-X, HR-P, C18-ec und C18-PAH und die Chromabond® NP-Säule PA eingesetzt. Im experimentellen Teil unter Kapitel 4.2.3 sind die genauen Zusammensetzungen der einzelnen Phasen aufgeführt.

Die einzelnen Säulen gemäß der Methode in Kapitel 4.2.6 äquilibriert und konditioniert. Anschließend wurden die Kartuschen mit jeweils 50 mL der Mixstamm-lösung (siehe Kapitel 4.2.7) beschickt und eluiert. Die Säule, die sich am besten bewährt hat, war die HR-P Säule von Macherey-Nagel. Mit dieser Phase wurden die gewünschte Selektivität und Aufkonzentrierung erreicht. Auch mit einem mit Holzkontakt hergestellten Rotwein hat sich diese Säule bewährt. Diese Säule be-

steht aus einem hochporösen Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer, welches sich für die Aufarbeitung von aromatischen und phenolischen Verbindungen eignet.

3.2.2 HPLC Quantifizierung

Die Kalibrierung der Referenzsubstanzen wurde in vier Schritten durchgeführt, da die verschiedenen Reinsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen. Von allen Reinsubstanzen wurde je nach Löslichkeit eine Stammlösung in einem Methanol-Wasser Gemisch hergestellt (siehe Kapitel 4.2.8). Der Standardmix wurde in einer weinähnlichen Matrix (siehe Kapitel 4.2.2) hergestellt und in fünf Konzentrationsleveln verdünnt. In Tabelle 4.9 sind die Konzentrationen der einzelnen Kalibrierlevel angegeben. Der interne Standard wurde zu jeder Verdünnungsstufe zugegeben. Anschließend erfolgte die SPE Aufarbeitung mit der Aufkonzentrierung (siehe Kapitel 4.2.6) und nachfolgender HPLC Messung (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.4). Für jede Verdünnungsstufe wurde eine dreifache Aufarbeitung durchgeführt und anhand der Ergebnisse die Kalibrierkurven und Geradengleichungen ermittelt.

Anschließend wurden die Substanzen aus Tabelle 4.6 in fünf Konzentrationen eingewogen und in weinähnlicher Matrix die Verdünnungen hergestellt. Diese Lösungen wurden jeweils dreifach aufgearbeitet und anschließend mit HPLC gemessen. Aus den Ergebnissen wurden für die einzelnen Substanzen die entsprechenden Kalibrierkurven und die Geradengleichungen erstellt. Der Korrelationskoeffizient der Geradengleichungen lag durchgehend über 0,96. Die Kalibrierung wurde in regelmäßigen Abständen überprüft. Hierfür wurde ein Wein ohne Holzkontakt mit einer bekannten Konzentration der Referenzsubstanzen versetzt, aufgearbeitet und mit HPLC vermessen.

3.2.3 Photometer Methodenentwicklung

Bei der photometrischen Farbmessung hat sich gezeigt, dass die Weißweine direkt, ohne Verdünnung gemessen werden konnten, die Rotweine wurden vor der Messung 1:5 mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Proben, die trüb erschienen, wurden vor der Analyse membranfiltriert. Die Probenvorbereitung und die Berechnung der Parameter, die in die statistische Analyse einbezogen wurden sind in Kapitel 4.2.10 dargestellt. Die Messungen wurden bei den Wellenlängen 420 nm, 520 nm und 620 nm durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.5).

3.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung mittels SPSS 16.0 und Unscrambler wurde aufgebaut auf den quantitativen Ergebnissen der Weine, die in Tabelle A.2 im Anhang aufgeführt sind. Zunächst wurde mit den gemessenen HPLC Daten eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, um eventuelle Tendenzen im Modell zu erkennen. Hierfür wurden die quantitativ bestimmten Konzentrationen der einzelnen Proben zunächst zentriert und anschließend standardisiert. Hierfür wurde der Mittelwert (μ) der Stichprobe einer Variable von jedem einzelnen gemessenen Wert (X) abgezogen. Anschließend wurde jeder einzelne zentrierte Wert durch die Standardabweichung (σ) der Stichprobe geteilt (siehe Gleichung 3.1).

In der Hauptkomponentenanalyse werden durch die ersten beiden PCs 45 % der Gesamtvarianz erklärt. Die weiteren PCs tragen nur unerheblich zur Modellbildung bei. Daher wurde der Scoresplot (siehe Abbildung 3.34) mit den ersten beiden Hauptkomponenten auf den beiden Achsen aufgetragen. Hierbei hat sich gezeigt, dass keine konkrete Trennung der Proben in die Gruppen Chips Weine bzw. Barrique Weine erfolgt ist. Die beiden Gruppen sind vollkommen durchmischt. Kennzeichnet man die Proben jedoch nach der Weinfarbe (Weißwein bzw. Rotwein), wird eine deutliche Trennung der zwei Gruppen erkennbar (siehe Abbildung 3.35), wobei die höchste Trennleistung auf der ersten Hauptkomponente liegt, die zweite Hauptkomponente hat keinen Einfluss auf die Aufspaltung.

Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die phenolischen Verbindungen entscheidend zur Weinfarbe beitragen (Alonso Borbalan et al. 2003; Bravo et al. 2006). Daher ist eine Trennung von Chips Weinen und Barrique Weinen mit einer *unsupervised* Technik wie der PCA nicht möglich. Dementsprechend wurden anschließend an die Hauptkomponentenanalyse *supervised* Methoden auf die Ergebnisse angewendet. Ziel war es, zunächst die Anzahl an Variablen auf ein Minimum zu reduzieren, um anschließende Messungen von unbekannten Proben zu vereinfachen. Diese Reduktion wurde soweit durchgeführt, dass eine Trennung der Proben im statistischen Modell signifikant und zufriedenstellend ausfiel.

Die Probencodierung wurde wie folgt vorgenommen. Weine, die mit Eichenholzstücken ausgebaut wurden, sind mit dem Code 1 versehen. Weine, die nicht mit Chips behandelt wurden, sind mit dem Code 0 versehen, wobei die Gruppe „nicht mit Chips behandelt“ beispielsweise Barrique Weine und Weine, die im Holzfass ausgebaut wurden, enthält. Die Proben wurden also eingeteilt in „Chips“ oder „nicht Chips“. Bei den authentischen Weinen wurden sämtliche Kontrollen bzw. Nullvarianten, die keinen Holzkontakt hatten, aus der statistischen Auswertung

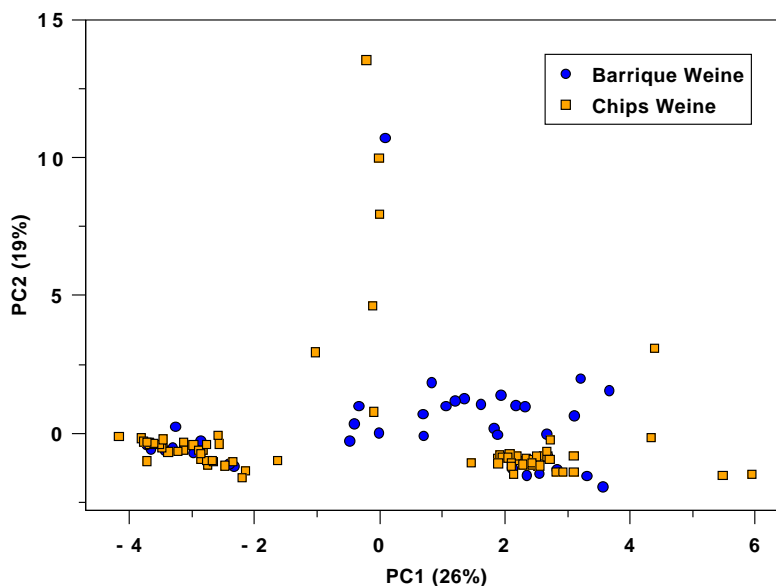


Abbildung 3.34: Hauptkomponentenanalyse der Ergebnisse der HPLC Messungen und der Farbmessungen. Aufgetragen sind die beiden ersten Hauptkomponenten PC1 und PC2. Die Kennzeichnung der einzelnen Proben in die beiden Gruppen Chips Weine und Barrique Weine zeigt keine Trennung.

ausgeschlossen. Dies ist damit begründet, dass in späteren Routineuntersuchungen nur Weine berücksichtigt werden, die entweder in der Sensorik durch Holzaromen auffallen oder mit „Barrique“ oder Ähnlichem bezeichnet sind. Die eingesetzten Handelsproben wurden bei den statistischen Auswertungen als unbekannt angesehen und nicht mit einem Code versehen. Sie sind somit ungruppiert. Hiermit ist bei der Klassifizierung ersichtlich, in welchem Bereich sich die ungruppierten Proben befinden.

3.2.5 1. Modell - HPLC-DAD

Es wurde eine schrittweise lineare Diskriminanzanalyse durchgeführt. Dieses Selektionsverfahren orientiert sich an der Zahl der Iterationen. In diesem Modell wurden 54 Iterationen durchgeführt, was der doppelten Anzahl an unabhängigen Variablen entspricht. Als unabhängige Variablen werden die quantitativ bestimmten Werte der einzeln gemessenen Substanzen eingesetzt, in diesem Fall 27 Verbindungen.

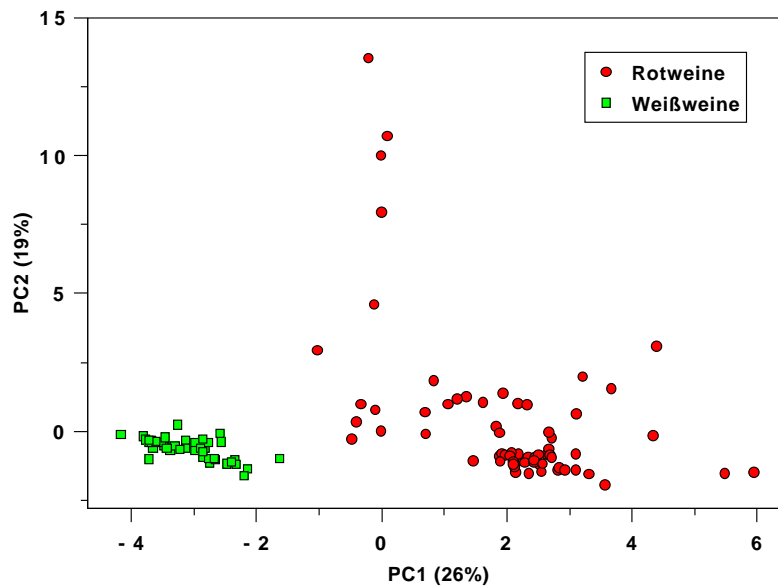


Abbildung 3.35: Hauptkomponentenanalyse der Ergebnisse der HPLC Messungen und der Farbmessungen. Aufgetragen sind die beiden ersten Hauptkomponenten PC1 und PC2. Die Kennzeichnung der einzelnen Proben in die beiden Gruppen Rotweine und Weißweine zeigt eine deutliche Trennung.

Die Signifikanz wird anhand des F-Wertes definiert. Der partielle F-Wert muss eine Untergrenze von 3,84 überschreiten, damit eine Variable in das Modell aufgenommen wird. Kommt eine weitere Variable hinzu, kann sich der partielle F-Wert der ersten Variablen verändern.

Sinkt dieser Wert unter die Obergrenze von 2,71, wird diese erste Variable wieder aus dem Modell herausgenommen. Folgende Variablen wurden in das 1. Modell aufgenommen:

- Sinapinaldehyd
- Scopoletin
- Protocatechualdehyd
- Tyrosol
- Phlorizin
- Ferulasäure

In Tabelle 3.21 werden die einzelnen Schritte des Selektionsprozesses dargestellt. Nach dem ersten Schritt ist die Variable Sinapinaldehyd als einzige Variable im

Schritt	Bezeichnung	Toleranz	F-Wert	Wilkt's Lambda
1	Sinapinaldehyd	1,000	17,627	
2	Sinapinaldehyd	0,675	45,532	0,920
	Scopoletin	0,675	33,502	0,839
3	Sinapinaldehyd	0,674	41,216	0,857
	Scopoletin	0,672	33,424	0,806
	Protocatechualdehyd	0,990	3,911	0,613
4	Sinapinaldehyd	0,668	40,437	0,771
	Scopoletin	0,526	45,807	0,803
	Protocatechualdehyd	0,787	9,761	0,589
	Tyrosol	0,647	9,627	0,588
5	Sinapinaldehyd	0,584	47,441	0,770
	Scopoletin	0,469	52,926	0,802
	Protocatechualdehyd	0,723	13,129	0,575
	Tyrosol	0,593	13,000	0,575
	Phlorizin	0,799	5,247	0,530
6	Sinapinaldehyd	0,465	17,880	0,573
	Scopoletin	0,442	58,415	0,794
	Protocatechualdehyd	0,712	9,983	0,530
	Tyrosol	0,531	16,944	0,568
	Phlorizin	0,772	6,771	0,512
	Ferulasäure	0,500	4,636	0,501

Tabelle 3.21: Ausgewählte Variablen nach der Analyse im 1. Modell mit den Ergebnissen der HPLC Messung (Quelle: Vogel (2010)).

Modell enthalten.

Die Toleranz ist definiert als $1 - R_i^2$, wobei R_i^2 der quadrierte multiple Korrelationskoeffizient zwischen der jeweils betrachteten Variable und der Gesamtheit der bereits im Modell enthaltenen Variablen ist. Besteht hier eine Korrelation, ergibt sich ein hoher R_i^2 Wert und damit ein niedriger Toleranzwert. Liegt der Toleranzwert unter 0,001, wird die Variable nicht in das Modell aufgenommen. Auch wird eine Variable nicht in das Modell aufgenommen, wenn sie den Toleranzwert einer bereits im Modell enthaltenen Variable unter 0,001 verringern würde. Da das Modell nach dem ersten Schritt erst eine Variable umfasst, kann der Toleranzwert noch nicht berechnet werden und wird somit auf 1 festgesetzt. Auf späteren Stufen sind die Toleranz- und F-Werte der im Modell enthaltenen Variablen entscheidend, ob eine Variable wieder aus dem Modell ausgeschlossen werden kann. Im zweiten Schritt wird Scopoletin in das Modell aufgenommen, da es von den verbleibenden Variablen noch den höchsten F-Wert bzw. das niedrigste Wilkt's Lambda aufweist. Der F-Wert lag bei 33,502 und somit über dem kritischen Wert von 3,84. Des Weiteren lag der Toleranzwert bei 0,675 und somit ausreichend hoch. Die folgenden

Schritte verliefen analog.

Die Ergebnisse der Klassifizierung des 1. Modells erhält man durch eine lineare Diskriminanzanalyse. Die Gruppencodes sind in diesem Fall wie oben erwähnt 1 für Weine mit Chips Kontakt und 0 für Weine ohne Chips Kontakt. Um Erkenntnisse über die Trennleistung dieses Modells zu erhalten, ist die Klassifizierungstabelle (Tabelle 3.22) wichtig. Hier wird das Klassifizierungsergebnis des 1. Modells dargestellt und der Probenumfang mit Codierung wird ersichtlich. Es waren insgesamt 75 Weine in der Gruppe 1 und 19 Weine in der Gruppe 0. Von den 19 Weinen wurden 13 richtig zur Gruppe 0 zugeordnet, was einer Trefferquote von 68,4 % entspricht. Allerdings wurden 31,6 % der Weine falsch positiv zur Gruppe 1 zugeordnet, was einer Menge von 6 Weinen entspricht. Von den 75 Weinen aus der Gruppe 1 wurden 73 richtig zugeordnet. Das heißt, 97,3 % wurden richtig eingruppiert. Lediglich 2,7 % wurden falsch positiv zugeordnet.

	Gruppe 0/1	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit		
		0	1	Gesamt
Anzahl	0	13	6	19
	1	2	73	75
Prozent %	0	68,4	31,6	100
	1	2,7	97,3	100

Tabelle 3.22: Klassifizierungstabelle 1. Modell (Quelle: Vogel (2010)).

Einen Hinweis darauf, wie stabil die Regressionsvorhersagen sind, erhält man durch eine Kreuzvalidierung. Bei dieser Methode wird von dem vorher berechneten Modell jeweils eine Probe ausgelassen, das Modell neu berechnet und die ausgelassene Probe als ungruppierte Probe analysiert. Dieses Verfahren wird für jede einzelne Probe durchgeführt. Somit kommt jede authentische Probe als Testfall zum Einsatz. In diesem Modell ist die Vorhersage sehr stabil, da exakt die gleichen Ergebnisse erzielt wurden wie bei der Klassifikation.

Da die Diskriminanzanalyse nur mit zwei Gruppen durchgeführt wurde, wurde nur eine Diskriminanzfunktion erhalten. Um diese graphisch darstellen zu können, wird eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und die erste Hauptkomponente als zweite Achse verwendet. Die erste Hauptkomponente wird auf der Y-Achse aufgetragen und die Diskriminanzfunktion auf der X-Achse (siehe Abbildung 3.36). Die Werte der einzelnen Proben werden gegen diese zwei Achsen auf-

getragen. Das daraus resultierende Streudiagramm zeigt deutlich die Clusterung der beiden Gruppen und auch die falsch zugeordneten Proben werden ersichtlich. Um das Modell mit unbekannten Proben zu überprüfen, wurden 29 Proben

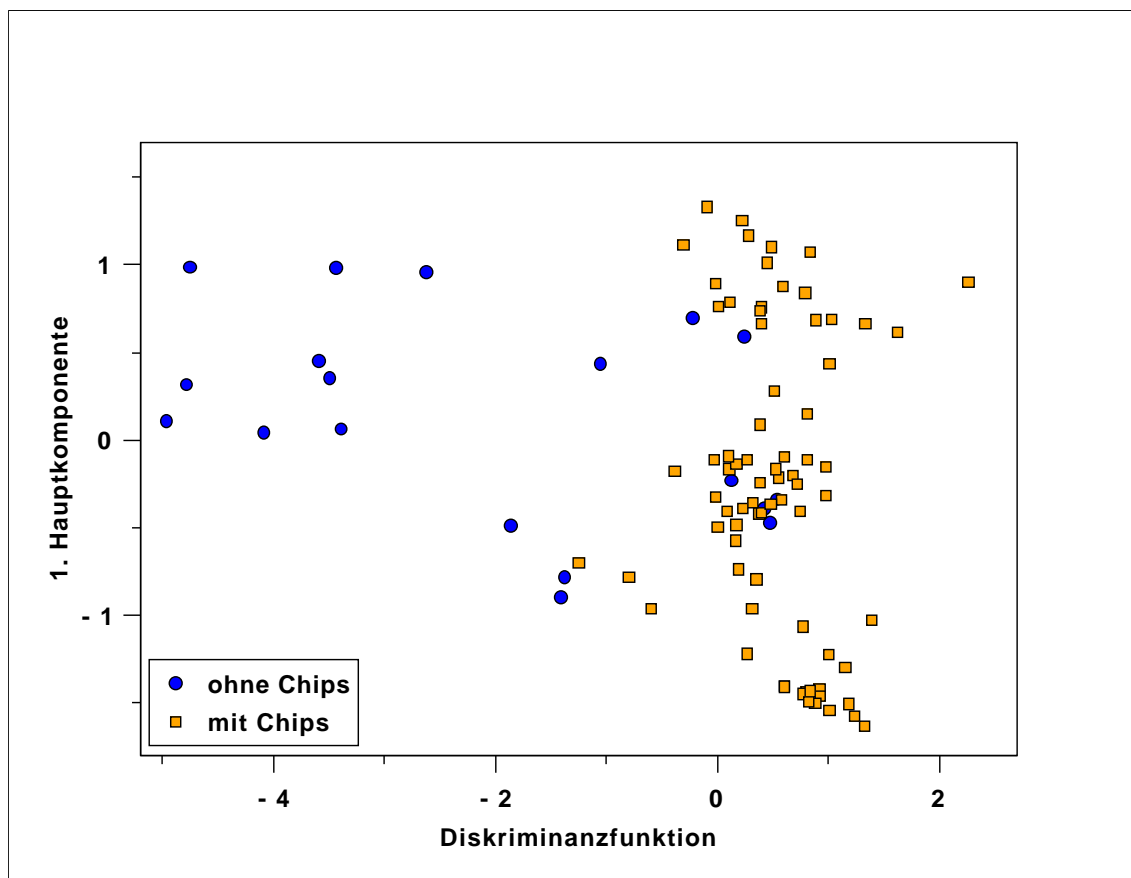


Abbildung 3.36: Diskriminanzanalyse der authentischen Proben mit den HPLC-Daten. Die Diskriminanzfunktion ist gegen die erste Hauptkomponente aufgetragen. Probencodierung „mit Chips“ gegen „ohne Chips“ (Quelle: Vogel (2010))

aus dem Handel verwendet, die einen großen Bereich der erhältlichen Weine abdecken sollen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Weine aus Franken, lediglich zwei Weine stammen aus Argentinien. Die Weine hatten laut der Etikettierung Holzkontakt.

3.2.6 2. Modell - HPLC-DAD+Farbmessung

Nun wurden die unabhängigen Variablen der HPLC-DAD Messung noch um die Werte der Farbmessung erweitert. Hierfür wurden die gleichen Proben, die schon mittels HPLC-DAD gemessen wurden, einer Farbmessung unterzogen. Es wurden die Werte bei 420 nm, 520 nm und 620 nm gemessen. Aus diesen Werten wurden

die Farbintensität (I), die Farbnuance (N), der prozentuale Gelbanteil (%G), der prozentuale Rotanteil (%R) und der prozentuale Blauanteil (%B) berechnet (siehe Kapitel 4.2.10) und in der statistischen Auswertung eingesetzt. Eine schrittweise Diskriminanzanalyse wird durchgeführt, um die Variablen herauszurechnen, die für die Trennung der Gruppen wichtig sind.

Die Anzahl der Iterationsschritte stieg von 54 auf 70 an, da durch die Hinzunahme der Farbmessung die Anzahl der unabhängigen Variablen gestiegen ist. Die Aufnahme bzw. der Ausschluss erfolgte wie im vorherigen Modell.

Auffallend war dabei, dass die Extinktion bei 620 nm im ersten Schritt als erster Parameter in das Modell aufgenommen wird. In den Schritten eins bis acht ist sie sogar die Variable mit der höchsten Unterscheidungskraft. Wird zusätzlich die Extinktion bei 520 nm mit aufgenommen, fällt die Extinktion bei 620 nm aufgrund der Toleranz und des F-Wertes aus dem Modell heraus. Im Schritt 15 wird dieser Parameter jedoch wieder in das Modell aufgenommen. Die in Tabelle 3.23 aufgeführten Variablen wurden nach der schrittweisen Diskriminanzanalyse mit in das 2. Modell aufgenommen.

Interessanterweise sind die aufgenommenen Parameter aus der HPLC Messung durch die Hinzunahme der Farbmessergebnisse nicht gleich geblieben. So sind die Variablen Scopoletin und Protocatechualdehyd nicht mehr im 2. Modell ent-

Schritt	Bezeichnung	Toleranz	F-Wert	Wilks's Lambda
17	E620	0,320	15,299	0,169
	4-Hydroxymizsäure	0,260	143,077	0,401
	Protocatechusäure	0,440	95,980	0,316
	Ferulasäure	0,156	69,231	0,267
	4-Hydroxybenzoesäure	0,108	86,357	0,298
	Tryptophol	0,236	35,103	0,205
	Tyrosol	0,424	17,605	0,174
	E520	0,026	39,829	0,214
	Vanillinsäure	0,058	21,912	0,181
	Gallussäure	0,060	18,787	0,176
	Prozentualer Blauanteil (%B)	0,135	26,585	0,190
	Kaempferol	0,298	14,445	0,168
	Phlorizin	0,280	12,679	0,165
	Farbnuance (N)	0,082	12,047	0,163
	Sinapinaldehyd	0,261	3,893	0,149

Tabelle 3.23: Ausgewählte Variablen nach der Analyse im 2. Modell mit den Ergebnissen aus der HPLC-Messung und der Farbmessung (Quelle: Vogel (2010)).

halten. Dafür sind die Verbindungen 4-Hydroxyzimtsäure, Protocatechusäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Tryptophol, Vanillinsäure, Gallussäure und Kaempferol hinzugekommen.

Bei diesem Modell ist die gleiche Anzahl an Proben wie im 1. Modell verwendet worden. Durch die Hinzunahme der Farbmessergebnisse verbesserte sich das Klassifizierungsergebnis, wie in Tabelle 3.24 zu sehen ist, deutlich. Es wurden alle 75 authentischen Weine, die mit Chips behandelt wurden, richtig zugeordnet. Dies entspricht einer Verbesserung von 97,3 % auf 100 %. Bei den authentischen Weinen ohne Chips wurde nur eine Probe von 19 falsch positiv zugeordnet. Das entspricht einer Verbesserung des Ergebnisses von 68,4 % auf 94,7 % im Vergleich zum 1. Modell.

Die anschließend durchgeführte Kreuzvalidierung ergab deutlich bessere Ergebnisse als beim 1. Modell. Die Weine, die mit Chips behandelt wurden, bestätigen in der Kreuzvalidierung das Ergebnis der Klassifizierung. Alle Proben wurden korrekt zugeordnet. Bei den ungechipsten Weinen verschlechterte sich das Ergebnis, es konnten nur 78,9 % richtig zugeordnet werden. Es wurden vier dieser Weine falsch positiv zugeordnet.

Um die Ergebnisse graphisch darzustellen, wurde wieder eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und die erste Hauptkomponente im Koordinatensystem auf der Y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse der Diskriminanzanalyse werden auf der X-Achse aufgetragen. In Abbildung 3.37 ist die Trennung der Weine mit Chips Kontakt gegen die Weine ohne Chipskontakt dargestellt. Deutlich ist die bessere Trennung verglichen zum 1. Modell erkennbar. Es sind nur geringe Überschneidungen erkennbar. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Farbe beim Ausbau

			Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit		
		Gruppe 0/1	0	1	Gesamt
Original	Anzahl	0	18	1	19
		1	0	75	75
	Prozent %	0	94,7	5,3	100
		1	0	100	100
		Gruppe 0/1	0	1	Gesamt
Kreuzvalidiert	Anzahl	0	15	4	19
		1	0	75	75
	Prozent %	0	78,9	21,1	100
		1	0	100	100

Tabelle 3.24: Klassifizierungstabelle 2. Modell (Quelle: Vogel (2010)).

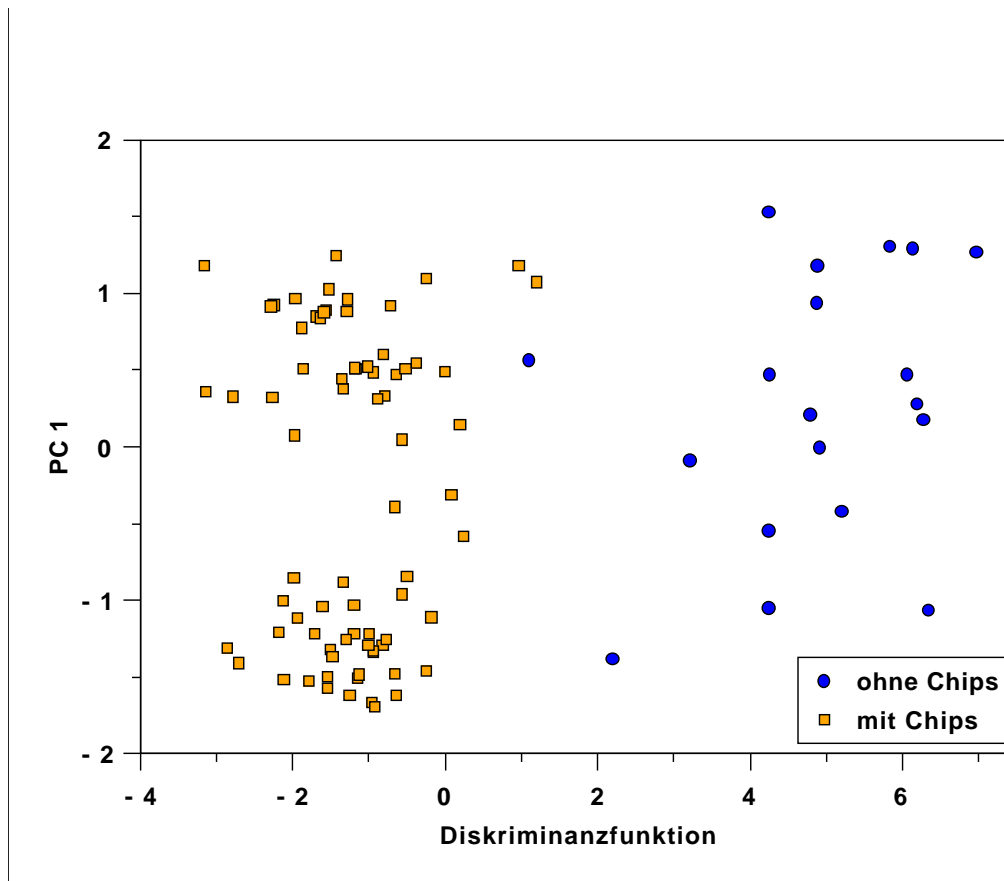


Abbildung 3.37: Diskriminanzanalyse der authentischen Proben mit den HPLC- und Farbdaten. Diskriminanzfunktion aufgetragen gegen die erste Hauptkomponente. Probencodierung „mit Chips“ und „ohne Chips“ (Quelle: Vogel (2010)).

von Wein mit Holz eine entscheidende Rolle spielt. Auch könnte die bessere Trennleistung des Modells auf den Sauerstoff zurückzuführen sein, der beim Barriqueausbau eine Rolle spielt (Del Álamo Sanza et al. 2004a).

Um das Modell zu überprüfen, wurden Handelsweine mit diesem Modell berechnet. Der Probenumfang sollte möglichst ein breites Spektrum der Weine auf dem regionalen Markt abdecken. Es handelte sich um Weine aus Franken, zwei Proben stammten aus Argentinien. Die Weine waren laut Etikett während der Herstellung mit Holz in Kontakt. Da die Frankenweine aus der Region stammten, war eine Rückverfolgung möglich und diese Proben können als B-authentische Proben gewertet werden.

Rebsorte	Herkunft	Typ	Chips 1/0 Zuordnung
Dornfelder-Merlot	Franken	Barrique	1
Regent-Dornfelder	Franken	Holzfass+Chips	0
Acolon Spätburgunder	Franken	Holzfass+Chips	1
Spätburgunder	Franken	Stahltank+Chips	0
Schwarzriesling	Franken	Stahltank+Chips	0
Spätburgunder	Franken	Barrique	0
Spätburgunder	Franken	Holzfass	0
Blaufränkisch	Franken	Barrique	0
Domina	Franken	Holzfass	0
Portugieser	Franken	Barrique	0
Portugieser	Franken	Barrique	1
Silvaner	Franken	Chips	0
Weißburgunder	Franken	Barrique	0
Acolon Spätburgunder	Franken	Holzfass+Chips	1
Regent-Dornfelder	Franken	Holzfass+Chips	0
Spätburgunder	Franken	Barrique	1
Malbec	Argentinien	Barrique	1
Malbec	Argentinien	Barrique	1
50 %Barrique	Franken	Barrique+Chips	0
25 %Barrique	Franken	Barrique+Chips	0

Tabelle 3.25: Zuordnung der Handelsweine im 2. Modell mit den Ergebnissen der HPLC Messung und der Farbmessung (Quelle: Vogel (2010)).

In Tabelle 3.25 sind die Ergebnisse der Zuordnung der Handelsweine dargestellt. Es konnten von den 20 Handelsproben 14 Weine richtig zugeordnet werden. Lediglich 6 Proben wurden falsch zugeordnet. Dies entspricht einer richtigen Klassifizierung von 70 %.

3.3 NMR-Analytik

Das NMR Gerät wird in der Routineanalytik zur Untersuchung von Weinen mittels der SNIF-NMR Methode (nach Martin et al. (1988)) eingesetzt. Der zweite vorhandene $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ Probenkopf wurde zunächst für die Untersuchungen zur Differenzierung eingesetzt. Problematisch bei diesem Probenkopf war einerseits, dass keine automatische Shimroutine verwendet werden konnte und andererseits keine exakte Temperatureinstellung möglich war. Diese beiden Parameter sind sehr wichtig für eine Reproduzierbarkeit der Spektren und zur anschließenden statistischen Analyse. Aus diesem Grund wurde ein neuer $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ Probenkopf mit einem GradShim System, das eine automatische Shimroutine beinhaltet, beschafft. Außerdem wurde dazu noch eine externe Temperiereinheit verwendet, die eine exakte Temperierung auf $\pm 0,1^\circ\text{C}$ gewährleistet.

Mit dieser Ausstattung wurde nun versucht, die authentischen Weine zu analysieren, wobei sich zu Beginn herausstellte, dass eine Messung ohne Aufarbeitung nicht zufriedenstellend war, da die Signale des Alkohols sehr dominierend waren. Daneben war auch das Wassersignal störend. Aus diesem Grund wurde versucht, eine Methode zu entwickeln, um einerseits die Lösungsmittel aus der Probe zu entfernen und andererseits auch eine Aufkonzentrierung der relevanten Inhaltsstoffe in der Probe zu erzielen. Eine elegante Lösung stellte die Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion dar. Hierfür wurden verschiedene Materialien getestet und die HR-P Phase von Macherey-Nagel hat sich erneut als sehr effizient erwiesen. Um die Lösungsmittel zu entfernen, wurde die Phase zunächst äquilibriert und nach dem Aufgeben der Probe auf die Säule ein Trocknungsschritt eingelegt. Anschließend wurde mit deuteriertem Methanol eluiert. Das Eluat wurde in ein 5 mm NMR-Röhrchen gegeben und mittels ^1H -NMR vermessen. Trotz des Trocknungsschrittes war eine Wasserunterdrückung nötig. Alkohol hingegen war nur in vernachlässigbarer Konzentration vorhanden. Mit dieser Methode konnten gute Ergebnisse erzielt werden (siehe Kapitel 4.3.5).

Im weiteren Verlauf gelang mit Hilfe der Firma Bruker, eine Mehrfachunterdrückung von Lösungsmittelsignalen zu bewerkstelligen und diese auch in der Automation einzusetzen. In Abbildung 3.38 sind die beiden Spektren eines Rotweins jeweils mit und ohne Lösungsmittelunterdrückung zu sehen. Das orange Spektrum wurde ohne Lösungsmittelunterdrückung aufgenommen, das braune Spektrum wurde mit Mehrfach-Lösungsmittelunterdrückung aufgezeichnet. Man sieht deutlich, dass die Signale, die um das Wassersignal bei ca. 4.6 ppm liegen,

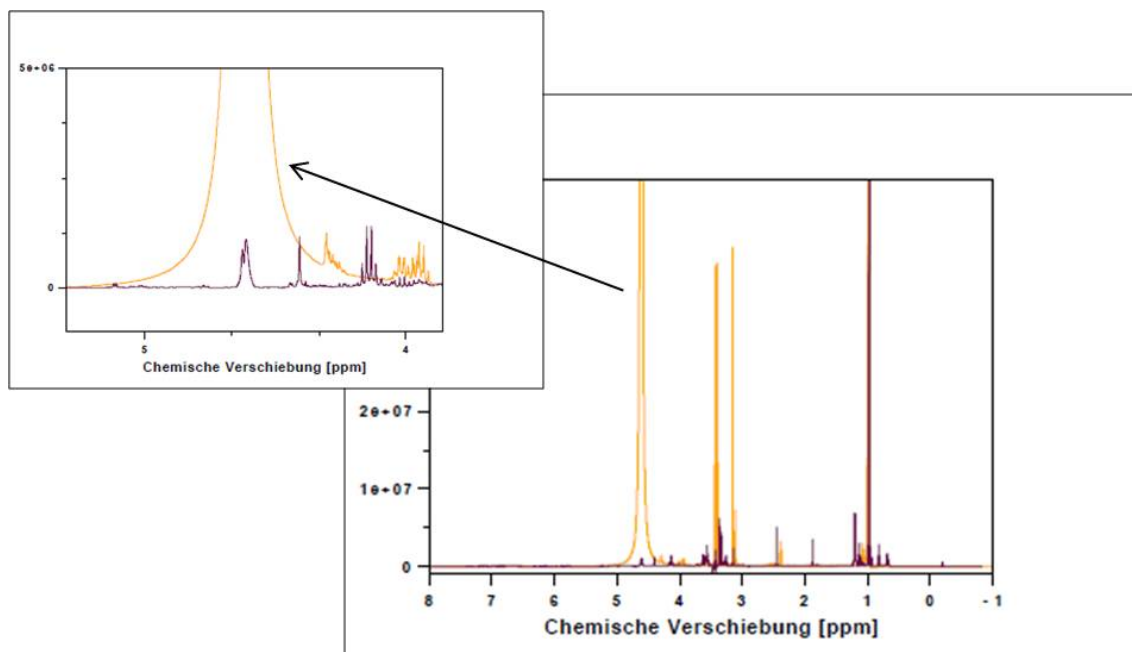


Abbildung 3.38: ^1H NMR Spektren eines Rotweins. Das Spektrum in Orange ist ohne Lösemittelunterdrückung aufgenommen. Das braune Spektrum ist mit Mehrfach-Lösemittelunterdrückung aufgenommen.

durch das große Signal nicht oder nur schlecht auszuwerten sind. Daher ist nur eine Messung mit Lösungsmittelunterdrückung geeignet.

Daher wurde die Aufbereitung der Proben mittels SPE hinfällig. Allerdings kommt auch diese Methode nicht ganz ohne Aufarbeitungsschritte aus. Die Proben müssen mit einem Puffer versetzt werden und anschließend auf einen bestimmten pH-Wert (exakt auf zwei Kommastellen) eingestellt werden. Dadurch, dass die Lösungsmittelunterdrückung so gut funktioniert, ist auch eine Aufkonzentrierung nicht mehr nötig, da in diesem Fall auch die relativ kleinen Signale des phenolischen Bereichs gut sichtbar und auswertbar werden.

Die Schritte der Entwicklung und Verbesserung der NMR-Methoden sind in Abbildung 3.39 dargestellt. Zunächst die Aufarbeitung mittels SPE und Messung am alten Probenkopf, anschließend ebenfalls die Aufarbeitung mittels SPE und Messung mit dem Gradienten Shim Kopf und zum Schluss die Vorbereitung der Probe mit Puffer und pH-Wert Einstellung und Messung mit dem Gradienten Shim Kopf dargestellt.

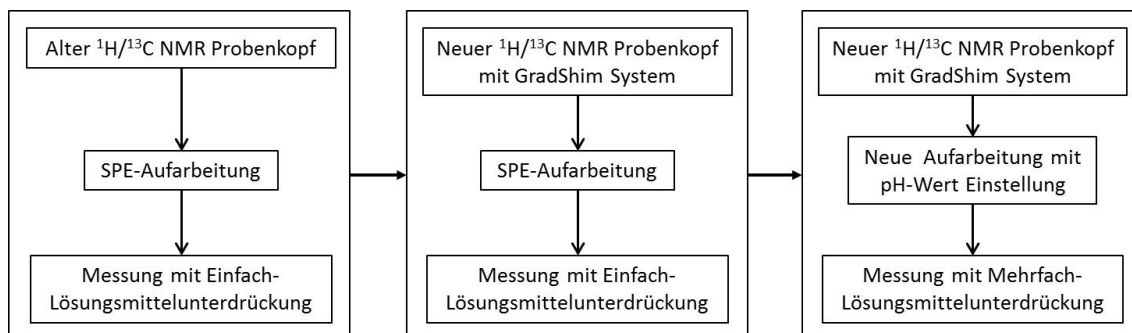


Abbildung 3.39: Entwicklung und Verbesserung der NMR Methoden

3.3.1 NMR-Messungen nach Festphasenextraktion

Anfänglich wurde versucht, die Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion durchzuführen. Die Auswahl der Säulen wurde anhand des Vergleichs der Spektren durchgeführt. Die HR-P Säule der Firma Macherey-Nagel hat sich hierbei als sehr effizient erwiesen. Die Extrakte der einzelnen Phasen, die für die Analyse getestet wurden, hatten alle unterschiedliche Farben, interessant war, dass der Extrakt der HR-P Säule der hellste war, jedoch das beste Ergebnis geliefert hat. Es wurde vermutet, dass höher molekulare Polyphenole auf der Säule zurückgehalten und somit das Spektrum besser als die anderen Extrakte aufgelöst wurde.

Es wurden 27 authentische Weine mittels ^1H -NMR (siehe Kapitel 4.3.8) gemessen. Davon waren 18 Proben Barrique Weine und 9 Proben Chips Weine. Die Spektren dieser Weine wurden mittels der Software AMIX (siehe Kapitel 4.5.2) mit Pattern Recognition Methoden untersucht. Die Spektren wurden in die beiden Gruppen Barrique Weine und Chips Weine eingeteilt. Die einzelnen Spektren wurden vor der statistischen Auswertung in sogenannte Buckets (Neidig 2005) unterteilt. Das heißt, dass jedes Spektrum in einzelne Abschnitte unterteilt wird und die Fläche, die in jedem Segment von den Signalen aufgespannt wird, wird als Parameter für die spätere Analyse eingesetzt. Diese Unterteilung erfolgte in diesem Fall durch eine gleichmäßige Aufspaltung der Spektren in 0,04 ppm breite Abschnitte. Nachdem jedes Spektrum in Buckets unterteilt worden war, wurde eine Hauptkomponentenanalyse mit den Buckets der einzelnen Proben durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen und um herauszufinden, wo die Buckets mit der meisten Information liegen.

Die Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 3.40) ergab eine deutliche Trennung der beiden Gruppen. Durch die SPE Aufarbeitung wird die Farbe der Weine entfernt. Somit ist eine Aufspaltung in die Gruppen Chips Weine und Barrique

Weine mit einer *unsupervised* Methode möglich, da die Farbe der Weine die Ergebnisse nicht überlagert. Die größte Information liegt auf der ersten Hauptkomponente, diese trägt am deutlichsten zur Trennung der beiden Gruppen bei. Die zweite Hauptkomponente enthält, bezüglich der Trennung, kaum Information.

Die wichtigsten ^1H -NMR Signale lagen in der Region der aromatischen Verbindungen in einem Bereich zwischen 5 ppm und 10 ppm. Dieses Ergebnis ist nachvollziehbar, da in dieser Region die Signale von phenolischen und polyphenolischen Verbindungen im Holz liegen (Pérez-Magariño und González-San José 2005).

Allerdings ist anzumerken, dass die Probenzahl in diesem Fall noch nicht ausreichend ist, da die PCA auf einer Bucketierung der Spektren aufbaut und somit erheblich mehr Variablen als Beobachtungen in die statistische Auswertung eingeflossen sind (Müller et al. 2011).

3.3.2 NMR-Messungen mit Mehrfachunterdrückung

Mit der Entwicklung der neuen Methode zur Lösungsmittelunterdrückung und der vereinfachten Aufarbeitung konnten die Messungen mit der SPE Aufarbeitung ein-

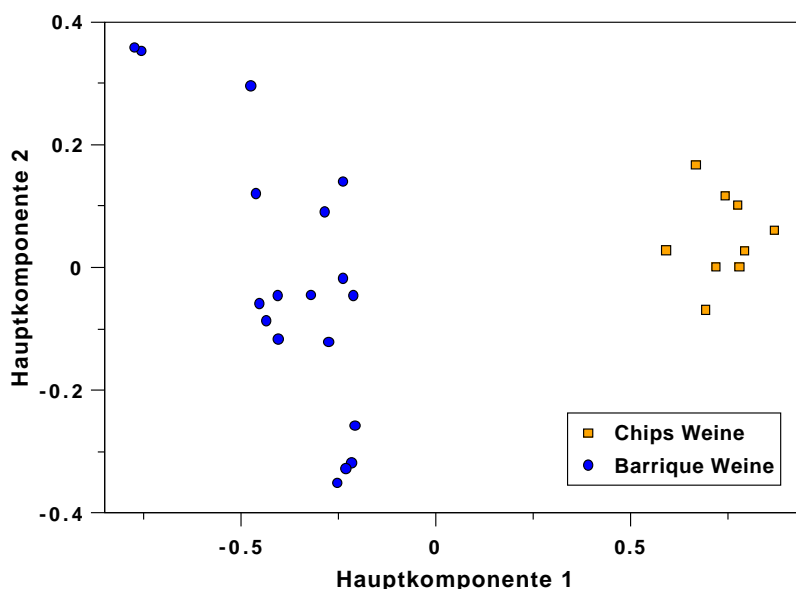


Abbildung 3.40: PCA Scoresplot der authentischen Proben, die mittels SPE Methode aufgearbeitet und anschließend mit ^1H NMR gemessen wurden. Es ist eine deutliche Trennung zwischen den Chips Weinen und den Barrique Weinen erkennbar.

gestellt und der Fokus auf die neue Methode gelegt werden. Vorteilhaft an dieser Methode ist der geringere Aufwand und die geringere Proben- bzw. Lösungsmittelmenge.

Am hauseigenen Gerät werden nicht nur ^1H -NMR Messungen durchgeführt, sondern auch ^2H -SNIF-NMR Messungen. Beide Methoden werden mit unterschiedlichen Probenköpfen durchgeführt. Das heißt, dass zwischen den einzelnen Messungen die Probenköpfe getauscht werden müssen. Hierfür wurde eine individuelle Routine entwickelt, die den Tausch vereinfacht und mit einem geringen Zeitaufwand möglich macht. Auch wurde die Routine so entwickelt, dass eine Vergleichbarkeit der Messungen vor und nach dem Umbau bei beiden Systemen gewährleistet ist.

Nach jedem Probenkopftausch muss das NMR-System überprüft werden, um eventuelle Veränderungen auszugleichen. Wird der ^1H -NMR Probenkopf eingebaut, erfolgt die Überprüfung mittels einer Saccharose-Lösung (siehe Kapitel 4.3.2). Hierbei wird mit der Probe ein zgpr Experiment, wie in Kapitel 4.3.8 beschrieben, durchgeführt und die Position des O1 Wertes (Lage des Wassersignals) überprüft. Dieser sollte bei mehrfacher Messung im Bereich um 1948 Hz liegen. Dieser Wert zeigt, ob das System stabil und unverändert zum Zeitpunkt vor dem Umbau geblieben ist.

Um eine möglichst geringe pH-Wert Schwankung zu gewährleisten, ist immer eine exakt gleiche Aufarbeitung einzuhalten. Auch ist die Temperatureinhaltung täglich zu überprüfen, damit die Messungen vergleichbar bleiben. Für die Temperaturkalibrierung (siehe Kapitel 4.3.7) wird eine Probe, bestehend aus deuteriertem Methanol und TSP zur Referenzierung (siehe Kapitel 4.3.1) verwendet. Diese Probe wird mittels des ^1H NMR Experiments in Kapitel 4.3.8 gemessen. Anschließend wird mit einer Brukeroutine die Temperatur anhand des Spektrums gemessen. Diese kann täglich leicht variieren und muss in der Automation angepasst werden, falls die Schwankung größer als 0.1 K ist.

Anschließend wurden die Proben mittels ^1H NMR gemessen, wobei in der Automation vier Experimente pro Probe durchgeführt wurden (siehe Kapitel 4.3.8). Das erste Experiment dient dazu, den O1 Wert der Probe zu messen. Dieser Wert gibt an, wo genau in der Probe sich das Wassersignal befindet. Diese Information ist wichtig für die im anschließenden NOESY Experiment durchgeführte Lösungsmittelunterdrückung. Aufbauend auf dem O1 Wert wird auf die Signale der beiden Lösungsmittel vor dem eigentlichen Experiment gezielt eingestrahlt, damit die-

se schon vorgesättigt sind und im Spektrum nicht oder nur sehr gering sichtbar sind. Beim dritten Experiment handelt es sich um eine zweidimensionale Messung (JRES) und das letzte Experiment dient zur Quantifizierung. Die beiden letzten Experimente wurden jedoch noch nicht in die Auswertung einbezogen, da diese für die beiden vorher genannten Experimente noch nicht ausgearbeitet ist. Allerdings können aber zu einem späteren Zeitpunkt aus diesen Daten Berechnungen durchgeführt werden und die Ergebnisse ausgewertet werden.

3.3.3 Validierung der NMR Methode mit Mehrfach-Lösungsmittelunterdrückung

Um die Durchführbarkeit der Methode und die Übertragbarkeit auf andere Geräte zu überprüfen, wurden ca. 150 authentische Proben, die vorher schon mittels GC-MS untersucht wurden, in Karlsruhe bei der Firma Bruker aufgearbeitet und mittels NMR gemessen. Die Aufarbeitung fand nach dem Schema in Kapitel 4.3.6 statt. Zunächst wurde die Aufarbeitung der Karlsruher Gruppe mit der Würzburger Gruppe verglichen. Hierfür wurde von jeder Gruppe der gleiche Wein jeweils 10 mal aufgearbeitet und gemessen. Anschließend wurden die Spektren miteinander verglichen, um eventuelle chemische Verschiebungen zu lokalisieren. Nachdem diese Überprüfung erfolgreich abgeschlossen war, wurden die restlichen 150 Proben von Würzburg aufgearbeitet und am Karlsruher NMR Gerät gemessen.

In Abbildung 3.41 sind die übereinandergelegten Spektren der Validierung zu sehen. Die geringe chemische Verschiebung im Ausschnitt zeigt, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Aufarbeitungen so gering sind, dass eine multivariate statistische Auswertung ohne weitere Datenpreprozessierung möglich ist.

Dieselben aufgearbeiteten Proben wurden in Würzburg wiederholt gemessen, um die Gerätevergleichbarkeit zu überprüfen. Nachdem dieser Vergleich positiv ausgefallen war, wurden die gleichen Proben nochmals in Würzburg aufgearbeitet und am Würzburger NMR vermessen, um die unterschiedliche Aufarbeitung zu vergleichen. Auch diese Überprüfung verlief positiv. Somit konnte die in Karlsruhe entwickelte Methode direkt auf das NMR Gerät in Würzburg übertragen werden. Anschließend wurden mit dieser Methode Weine gemessen, die auch schon mittels GC-MS untersucht wurden. Zunächst wurde diese Methode bei der Firma Bruker in Karlsruhe mit den gleichen authentischen Proben, die auch mittels GC-MS gemessen wurden, durchgeführt. Diese Proben wurden hierfür nach der GC-MS Messung in spundvoll abgefüllten Flaschen zurückgestellt und im Kühlraum gelagert.

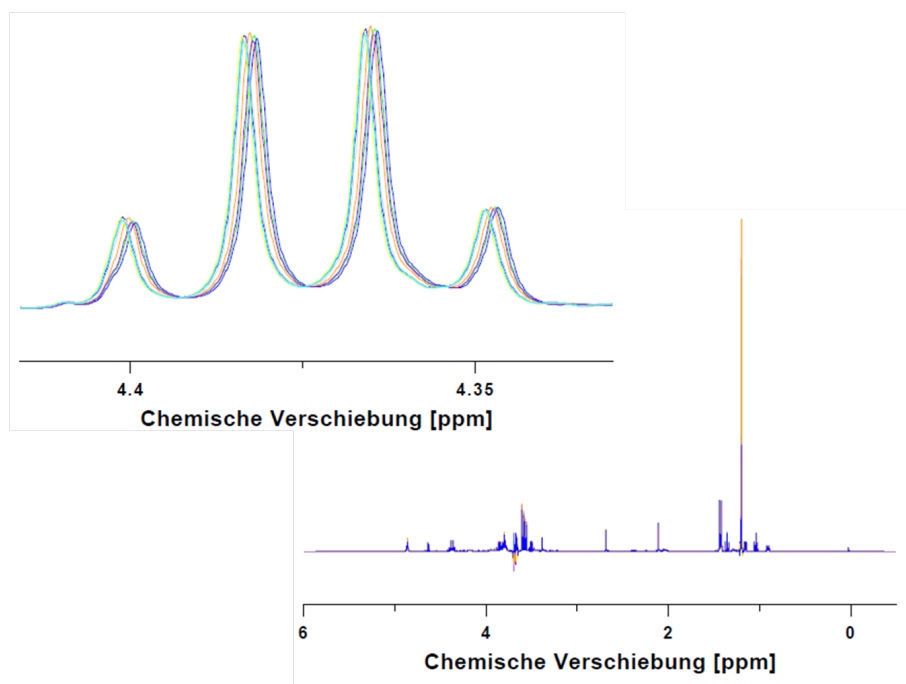


Abbildung 3.41: Spektren zum Vergleich der einzelnen Messungen mehrfach aufgearbeiteter Proben.

Zusätzlich zu den authentischen Proben wurden auch Handelsproben gemessen. Diese Proben stammten hauptsächlich aus Franken aus der Qualitätsweinprüfung. Die Messungen der authentischen Proben zeigten zunächst ohne statistische Auswertungen die Unterscheidbarkeit von Jahrgang und Farbe der Weine. Durch Aufeinanderlegen der Spektren wurde ein deutlicher Unterschied erkennbar (Alonso Borbalan et al. 2003; Bravo et al. 2006; Lee et al. 2009).

Für die statistische Auswertung zur Trennung der beiden Gruppen Chips- bzw. Barriqueweine ist vor allem der Bereich der Spektren zwischen 5 und 10 ppm interessant, da in diesem Abschnitt vor allem die aromatischen Verbindungen liegen (Ferrari et al. 2011). Diese Komponenten spielen eine entscheidende Rolle beim Ausbau von Weinen mit Eichenholz. In Abbildung 3.42 ist ein Ausschnitt des aromatischen Bereichs beispielhaft dargestellt.

Aus diesem Ausschnitt des Spektrums wird ersichtlich, dass die beiden Spektren prinzipiell die gleiche Form haben, aber in einzelnen Signalen werden minimale Unterschiede deutlich. So sind die Signale des Barrique Weins bei 6,2 ppm und 6,4 ppm höher als die des Chips Weines. Bei 5,6 ppm und 6,3 ppm sind die Signale des Chips Weins höher als die des Barrique Weins. Diese feinen Unterschiede können in der statistischen Auswertung genutzt werden, um zwischen diesen beiden Gruppen zu differenzieren.

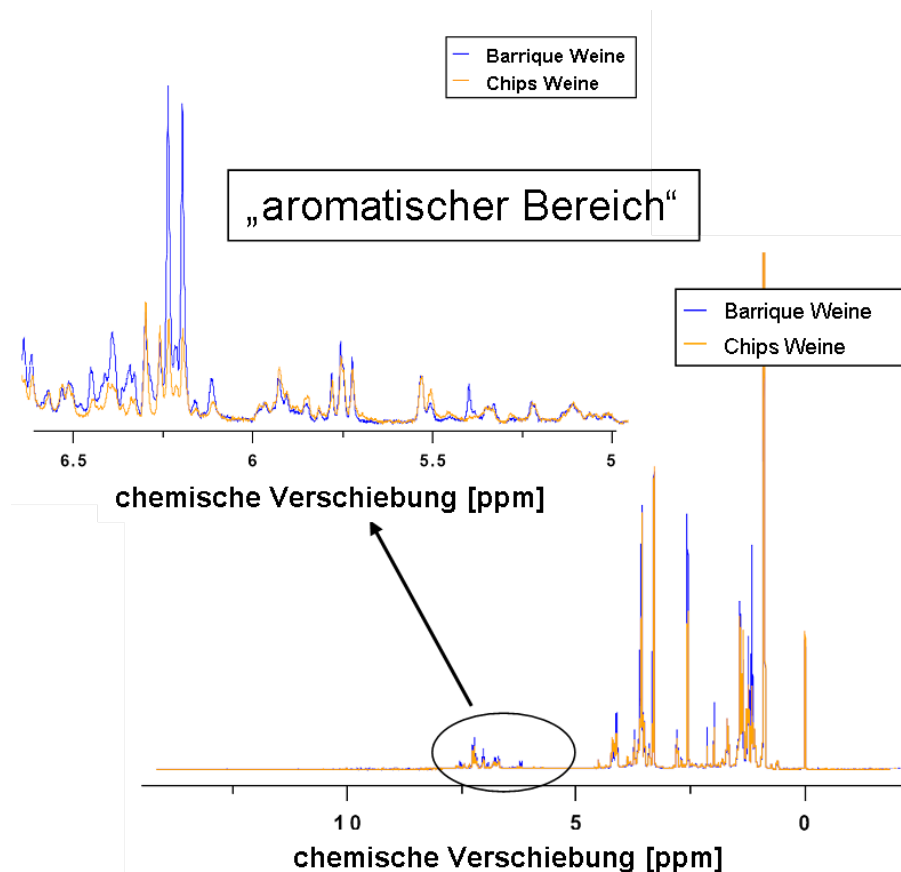


Abbildung 3.42: Ausschnitt aus den NMR Spektren zweier Weine (Barrique Wein und Chips Wein) mit Mehrfachunterdrückung. Hervorgehoben ist der aromatische Bereich.

Bei den NMR Analysen wurden keine absoluten Konzentrationen einzelner Stoffe gemessen. Die Auswertung der Spektren erfolgte über den Vergleich der Spektren. Um nun statistische Rechnungen durchführen zu können, wurden die Spektren über den Referenzpeak ausgerichtet und jedes Spektrum in Abschnitte von 0,02 ppm aufgeteilt (siehe Abbildung 2.10). Die Signale, die in jedem dieser Abschnitte vorhanden sind, werden als Ganzes integriert und es wird somit die Fläche zur weiteren Analyse herangezogen.

Legt man mehrere Spektren übereinander und betrachtet einzelne Ausschnitte daraus, werden sogar mit bloßem Auge Unterschiede erkennbar. Die Ursache der Unterschiede war zum einen die Farbe des Weines und zum anderen der Jahrgang. So war zu erwarten, dass die Spektren der Weißweine sich von denen der Rotweine unterscheiden, vor allem im Bereich der phenolischen Verbindungen, da gerade diese für die Farbe von Trauben verantwortlich sind.

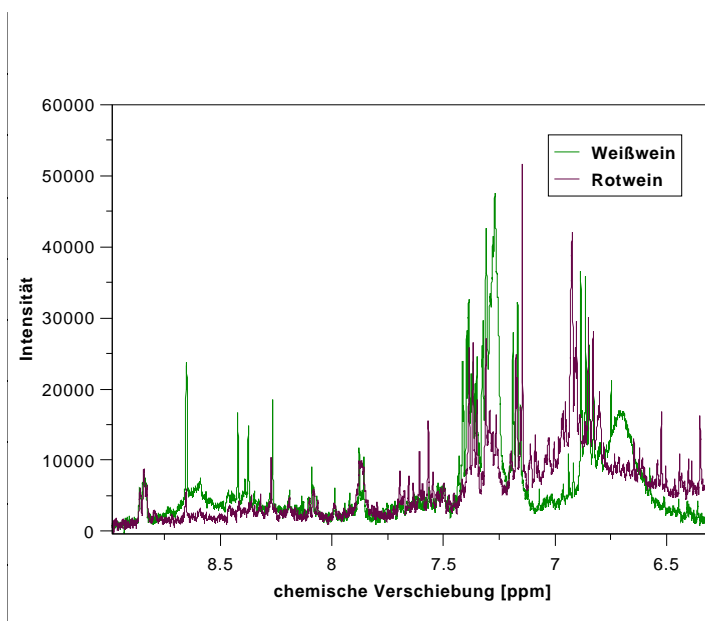


Abbildung 3.43: ^1H -NMR Spektrenvergleich von je einem Rot- und Weißwein.

In Abbildung 3.43 sind beispielhaft die Spektren von jeweils einem Rot- und Weißwein dargestellt. Deutlich erkennbar sind die unterschiedlichen Signale vor allem im phenolischen Bereich des Spektrums zwischen 6 und 9 ppm.

Auch der Jahrgang des Weins hat Einfluss auf das NMR Spektrum. Legt man die Spektren der Weine der Bayerischen Landesanstalt für Wein- und Gartenbau, Veitshöchheim von 2006 und 2007 übereinander, sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Dabei ist zu beachten, dass in beiden Jahrgängen bei den Weißweinen die gleiche Rebsorte verwendet wurde (Silvaner). In Abbildung 3.44 sind beispielhaft die Spektren eines mit Eichenholzchips behandelten Silvaners aus dem Jahr 2006 und 2007 übereinandergelegt. Die Unterschiede sind vor allem im Bereich zwischen 6,5 und 7 ppm sowie zwischen 8 und 9 ppm zu sehen.

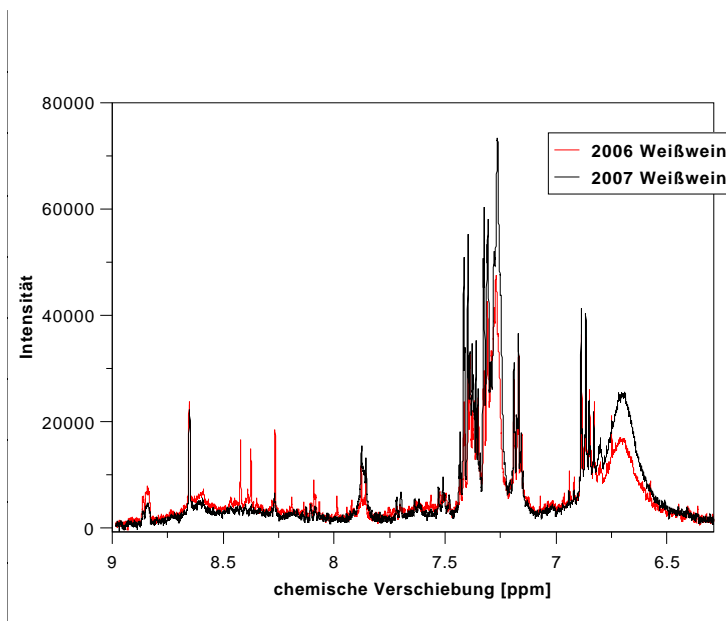


Abbildung 3.44: ^1H -NMR Spektrenvergleich von einem gechipsten Silvaner aus dem Jahr 2006 und 2007.

Zunächst wurden die Proben ohne Codierung einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen, um eventuelle Tendenzen im Muster der Daten zu erkennen. Diese statistische Analyse ist hilfreich, um einen Überblick über den Datensatz zu bekommen.

Zur Veranschaulichung wurde ein Scoresplot (Abbildung 3.45) erstellt, der die Scores der einzelnen Proben darstellt, wobei die Koordinaten durch die ersten beiden Hauptkomponenten der einzelnen Proben festgelegt sind. Es wurden die ersten beiden Hauptkomponenten zur Erstellung der Graphik verwendet, da in diesen die meiste Varianz enthalten ist. Je näher die einzelnen Proben im Scoreplot beieinander liegen, desto ähnlicher sind sie bezüglich der beiden Hauptkomponenten.

Die PCA zeigt, wie schon mit bloßem Auge erkennbar, ist eine Trennung der Proben in Rot- bzw. Weißwein. Diese folgt hauptsächlich über die X-Achse, also über die erste Hauptkomponente. Es werden 44 % der gesamten Varianz über die erste PC erklärt, die zweite PC erklärt weitere 15 %. Somit werden durch die ersten beiden Hauptkomponenten 59 % der Gesamtvarianz beschrieben.

Da die Hauptkomponentenanalyse ohne gruppierende Variablen arbeitet, ist sie zur Trennung der beiden Gruppen Chips bzw. Barrique nicht geeignet. Denn die Unterschiede in den Spektren bezüglich der Weinfarbe sind deutlicher als die Unterschiede, die die Gruppen Chips bzw. Barrique ausmachen. Wird nun die Daten-

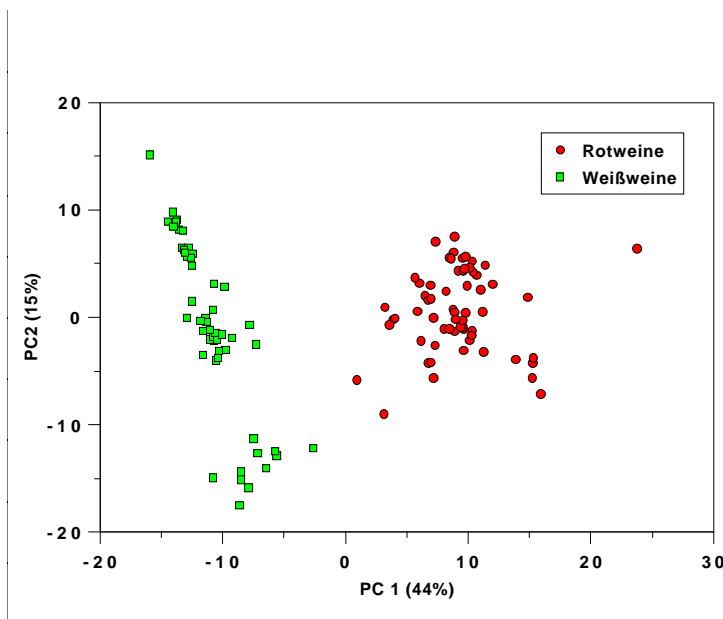


Abbildung 3.45: PCA Scoresplot der authentischen ^1H -NMR Proben. Trennung in Rot- bzw. Weißwein ist erkennbar.

matrix mit Gruppencodes versehen, wird die Berechnung auf genau die gewünschte Unterscheidung gelenkt.

Um die Gruppenzugehörigkeit der authentischen Proben zu berücksichtigen, wurde eine PLS Analyse durchgeführt, bei der die beiden Gruppen Chips und Barrique mit einem Gruppencode, einer sogenannten *dummy*-Variablen, versehen wurden. Der Gruppencode war für die Chipsweine -1 und für die Barriqueweine 1. Um die Trennung der beiden Gruppen graphisch darzustellen, wurde zusätzlich zur PLS eine PCA durchgeführt.

Die erste Hauptkomponente kann nun gegen die 20 Faktoren der PLS aufgetragen werden und somit die Trennung der beiden Gruppen dargestellt werden. Bei dieser Analyse ist es möglich, die Informationen der einzelnen Faktoren aufzusummieren und somit den Informationsgehalt zu steigern. In Abbildung 3.46 sind die beiden Gruppen signifikant voneinander getrennt.

Deutlich wird, dass die Trennung über die X-Achse erfolgt, welche die gesamte Information der 20 Faktoren enthält. Diese Achse zeigt die Zuordnung der Proben zu ihren mit Gruppencodes versehenen Clustern. Auf der negativen Achse um die Zahl -1 sind die Chips Weine gruppiert, dahingegen sind um die Zahl 1 die Barrique Weine gruppiert.

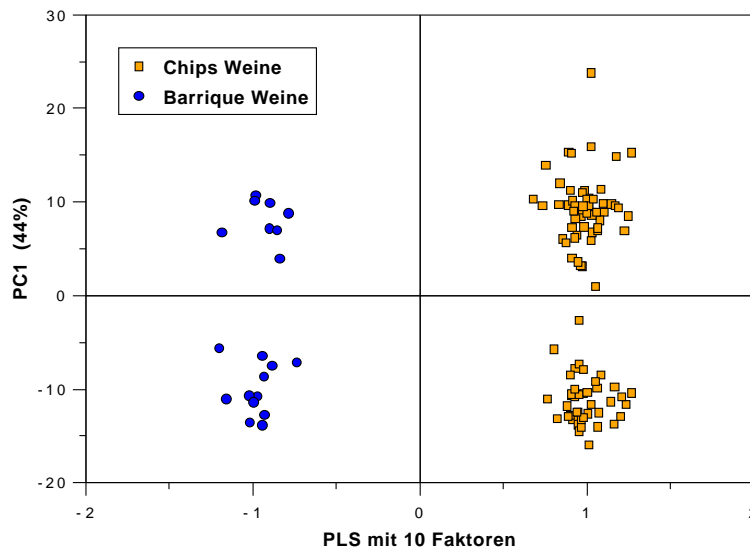


Abbildung 3.46: 20 Faktoren der PLS aufgetragen gegen die erste Hauptkomponente PC1 der authentischen Proben, die mittels NMR gemessen wurden.

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass eine Tendenz bezüglich der Y-Achse sichtbar ist. Dieser Trend ist durch die Farbe bedingt. Der obere Cluster zeigt die Rotweine, der untere die Weißweine an. Wie schon vorher erwähnt, enthält die erste Hauptkomponente die meiste Varianz und zeigt die Trennung bezüglich der Farbe. Aber obwohl die Farbe einen so deutlichen Einfluss hat, kann die PLS die Bereiche der Spektren herausfiltern, die nur zur Trennung der beiden Gruppen Chips oder Barrique beitragen.

Im Rahmen der Qualitätsweinprüfung und der Routineanalysen im Haus wurden diverse Weine untersucht, die mit Holz ausgebaut wurden. Diese Gruppe von Proben wurde als B-authentische Proben angesehen, da davon ausgegangen werden kann, dass diese Proben gemäß der erfolgten Kennzeichnung hergestellt wurden. Aufgrund der Tatsache, dass A-authentische Proben schwer zu beschaffen sind und ein statistisches Modell besser wird, je mehr Proben eingesetzt werden, ist es sinnvoll, auch die B-authentischen Proben in die Modellbildung miteinzubeziehen. Es ist jedoch zu beachten, dass in diesem Fall extreme Ausreißer genau überprüft werden müssen und gegebenenfalls aus dem Modell ausgeschlossen werden müssen.

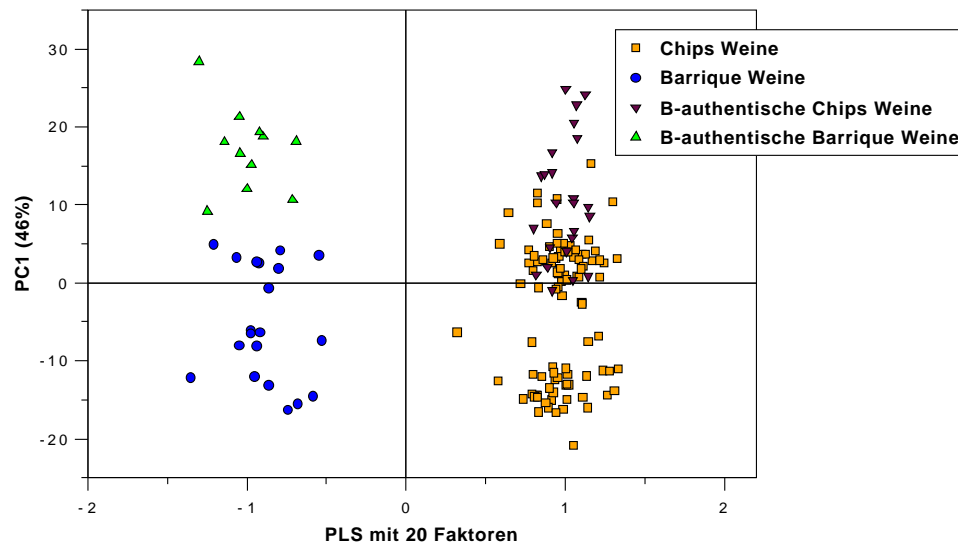


Abbildung 3.47: 20 Faktoren der PLS aufgetragen gegen die erste Hauptkomponente PC1 der authentischen Proben und B-authentischen Proben, die mittels NMR gemessen wurden.

In Abbildung 3.47 ist das Modell mit den authentischen und B-authentischen Proben mit 20 Faktoren dargestellt. Auch hier ist eine deutliche Trennung der Gruppen zu erkennen. Extreme Ausreißer waren nicht dabei.

Es wurde nun versucht, mit dem erstellten PLS Modell, welches sowohl die authentischen als auch die B-authentischen Proben enthält, unbekannte Weine den einzelnen Gruppen zuzuordnen. Mit der sogenannten PLC-prediction wird ein bestehendes PLS Modell mit bekannten Proben als Grundlage verwendet, um unbekannte Proben in die vorher bestimmten Klassen zuzuordnen. Die beiden Klassen in dem hier verwendeten Modell sind mit -1 für die Barriqueweine codiert und mit 1 für die Chipsweine. Durch die PLS-prediction wird nun versucht, die unbekannten Proben mit Hilfe des Modells einer der beiden Gruppen -1 bzw. 1 zuzuordnen.

Hierfür wurden 64 Weine aus dem Handel verwendet, wobei davon 42 Weine als Barrique gekennzeichnet waren, 10 Weine mit Chips behandelt wurden und 12 Weine im Barrique in Kombination mit Chips ausgebaut wurden (siehe Tabelle A.3). Wie in Abbildung 3.48 zu sehen ist, wurde der Großteil der Weine richtig zugeordnet. Es liegen zwar einige Weine auf der Grenze, aber auch die Weine, die sowohl mit Chips und Barrique ausgebaut wurden, konnten bis auf 2 Proben der Gruppe Chips zugeordnet werden. Im Ganzen kann man sagen, dass die unbekannten Proben richtig klassifiziert wurden. Es ist aber anzumerken, dass dieses

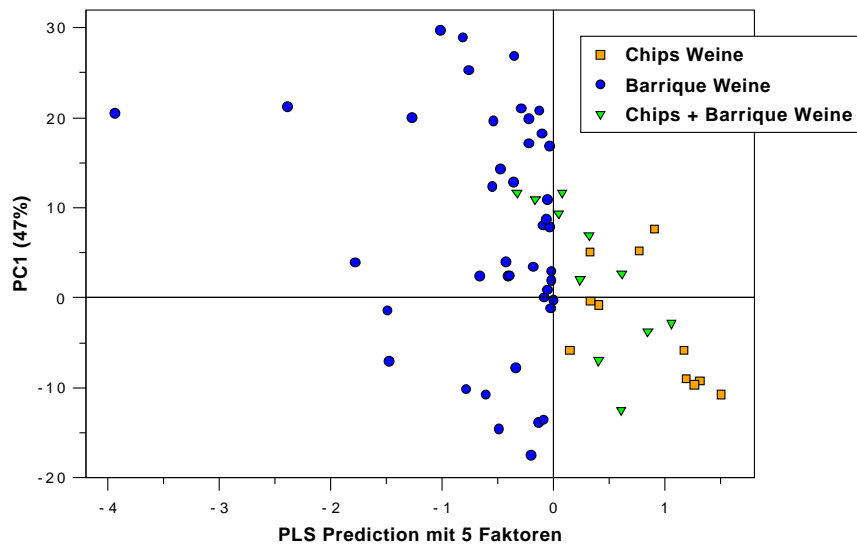


Abbildung 3.48: Zuordnung der unbekannten Proben zu einer der beiden Gruppen, die mit den Variablen 1 für Barrique und -1 für Chips gekennzeichnet sind.

Ergebnis nicht als absolut zu werten ist, sondern diese Methode als Screeningverfahren zu betrachten ist. In der Praxis heißt das, dass ein Wein, der als Barrique gekennzeichnet wurde und im Modell als Chips klassifiziert wurde, nochmals betrachtet werden muss. Zunächst wird die Messung auf Fehler überprüft; ist kein Fehler vorhanden, wird die Probe nochmals aufgearbeitet und vermessen. Fällt dieser Wein wieder auf, wird der Hersteller kontaktiert oder von der Weinkontrolle aufgesucht, um eventuelle Unregelmäßigkeiten aufzuklären.

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller
2-Octanol (interner Standard)	123-96-9	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methylcinnamat (interner Standard)	1754-62-7	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ϵ -Decalacton (interner Standard)	5579-78-2	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Furfural	98-01-1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Furfurylalkohol	98-00-0	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-Methylfurfural	620-02-0	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylacetaldehyd	122-78-1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Guaiaicol	90-05-1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Ethylphenol	123-07-9	Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland
4-Methylguaiaicol	93-51-6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-Hydroxymethylfurfural	67-47-0	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Ethylguaiaicol	2785-89-9	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>cis</i> -Whiskylacton	39212-23-2	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd	10551-58-3	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>trans</i> -Whiskylacton	55013-32-6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2,6-Dimethoxyphenol	91-10-1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eugenol	97-53-0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4-Propylguaiaicol	2785-87-7	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β -Damascenon	23696-85-7	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Vanillin	121-33-5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetovanillon	498-02-2	Merck, Darmstadt, Deutschland
δ -Decalacton	705-86-2	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Hydroxy-3-methylacetophenon	876-02-8	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylvanillat	617-05-0	ABCR, Karlsruhe, Deutschland
2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol	6627-88-9	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Syringaaldehyd	134-96-3	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4.1: Verwendete Referenzsubstanzen für die GC-MS Methode mit CAS-Nummer und Hersteller.

4 Experimenteller Teil

4.1 GC-MS

4.1.1 Chemikalien

Für die Aufarbeitung wurden Dichlormethan Rotisolv Pestilyse (Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland), Methanol für die HPLC (Firma Promochem, Middlesex, U.K.) und Ethanol 99.7-100% v/v (Firma VWR international Ltd, West Chester, PA, USA) verwendet. Die Referenzsubstanzen waren alle in analytischer Reinheit verfügbar und wurden von den Firmen Alfa Aeser, Sigma Aldrich, Lancaster, Promochem, Roth und VWR bezogen und sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

4.1.2 Lösungen und Weine für Modellversuche

Für die Modellversuche wurde der folgende Modellwein hergestellt und die vier handelsfertigen Weine verwendet.

- Modellwein 13 % vol. Ethanol in Wasser; Zusatz von je 3 g/L Weinsäure und Glycerin, mit NaOH auf pH 3,30 eingestellt
- Weißwein: Firma Cruzares, Spanischer Tafelwein weiß, in Tetra Brik, 10,5 % vol.
- Rotwein: Firma Cruzares, Spanischer Tafelwein rot, in Tetra Brik, 10,5 % vol.
- Bacchus 2008, Hersteller LWG
- Portugieser 2008, Hersteller LWG

4.1.3 Standardlösungen

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Aufarbeitungen zu erreichen, wurde mit einem Internen Standardmix gearbeitet, der vor der Aufgabe auf die Festphasenkartuschen zur Probe gegeben wurde. Dieser bestand aus 2-Octanol, ϵ -Decalacton und Methylcinnamat. Die Konzentrationen in der Mixtlösung entsprachen jeweils 100,00 mg in 10 mL Dichlormethan. Von dieser Lösung wurden 10 μ L auf 50 mL Probe aufgetragen, was einer Konzentration von 200 μ g pro Liter Probe entspricht.

4.1.4 GC-MS Gerät

Bei dem GC-MS System handelt es sich um einen Varian 3900-Gaschromatographen, der mit einem Saturn 2100T-Ioneneinfangdetektor gekoppelt war. Die verwendete Säule war eine Varian VF-5 MS-Säule (5% Phenyl-95%-dimethyl-polysiloxan; 30 m Länge x 0,25 mm ID x 0,25 μ m Filmdicke), Firma Varian. Das System arbeitet mit einem CombiPAL Autosampler von CTC Analytics und wurde mittels der Software MS Workstation 6.42, Firma Varian, gesteuert.

4.1.5 GC-MS SPE-Methode

Es wurde zur SPE Methodenentwicklung und Analytik der Proben eine SPE-Vakuumkammer der Firma J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA und ein GC-MS System der Firma Varian, Santa Clara, CA, USA verwendet (siehe Kapitel 4.1.4).

Zur Aufkonzentrierung und Aufreinigung wurden die SPE-Säulen LiChrolut® EN der Firma Merck verwendet. Die Phase besteht aus einem Ethyl-Vinyl-Benzol-Divinylbenzol-Polymer. Die SPE Säulen bestanden aus Polypropylen und waren mit 200 mg Phasenmaterial bestückt, bei einem Volumen von 3 mL.

4.1.6 GC-MS flüssig/flüssig-Extraktion

Für die Methodenentwicklung und Aufarbeitung der Proben wurde eine Apparatur zur flüssig/flüssig-Extraktion nach Kutscher-Steudel, eine Destillationsapparatur zur Konzentrierung von Aromaextrakten, bestehend aus einer Vigreux-Kolonne (ca. 30 cm), einer Destillierbrücke und einem Kühler, und ein GC-MS System der Firma Varian, Santa Clara, CA, USA verwendet.

4.1.7 Chromatographische Bedingungen SPE-Methode

GC-Parameter

- Säulentemperatur 50°C für 0 Minuten
- Aufheizen auf 80°C mit 3°C/min
- Säulentemperatur 80°C für 10 Minuten
- Aufheizen auf 240°C mit 5°C/min
- Säulentemperatur 240°C für 5 Minuten

Weitere Geräteparameter

- Injektortemperatur 240°C
- Split-Verhältnis 1:10
- Flüssiginjektion mit 10 µL Spritze; Injektionsvolumen 1 µL
- Trägergasfluss (Helium) konstant bei 1 mL/min
- Ionisierungsmodus: Elektronenstoßionisation mit Automatic Gain Control
- Bis zwei Minuten: Solvent Delay
- 2 Minuten bis 45 Minuten Scanmodus: Massenbereich zwischen 35 und 200 m/z

4.1.8 Chromatographische Bedingungen flüssig/flüssig-Extraktion

GC-Parameter

- Säulentemperatur 50°C für 0 Minuten
- Aufheizen auf 80°C mit 3°C/min
- Aufheizen auf 240°C mit 5°C/min
- Säulentemperatur 240°C für 5 Minuten

Weitere Geräteparameter

- Injektortemperatur 240°C
- Split-Verhältnis 1:10
- Flüssiginjektion mit 10 µL Spritze; Injektionsvolumen 1 µL
- Trägergasfluss (Helium) konstant bei 1 mL/min
- Ionisierungsmodus: Elektronenstoßionisation mit Automatic Gain Control
- Bis zwei Minuten: Solvent Delay
- 2 Minuten bis 45 Minuten Scanmodus: Massenbereich zwischen 40 und 400 m/z

4.1.9 Probenvorbereitung für die SPE-Methode

Die Probenaufarbeitung wurde sowohl für die Kalibrierung als auch für die einzelnen Proben durchgeführt. Angelehnt an die Methode von López et al. (2002) wurde die Aufarbeitung an die Gegebenheiten angepasst.

Hierfür wurden die Festphasenkartuschen zunächst mit 3 mL Dichlormethan, anschließend mit 3 mL Methanol und 3 mL einer 13% vol. Ethanol-Wasserlösung konditioniert. Nach dem Aufsatz des Probenvorratsgefäßes wurden 50 mL Probe einpipettiert und mit 100 µL des Internen Standard Gemisches versetzt. Die Flüssigkeit wurde über das Säulenmaterial geleitet und anschließend die Säule ca. 15 Minuten trocken laufen gelassen. Die Kartusche wurde zweimal 0,5 mL Dichlormethan beschickt und das Eluat in einem GC-Vial aufgefangen. Das verschlossene Probengefäß wurde bis zur GC-MS Analyse im Tiefkühlschrank bei -18°C aufbewahrt.

4.1.10 Probenvorbereitung für die flüssig/flüssig-Extraktions Methode

Für die Modellversuche wurde einerseits die Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion wie oben beschrieben durchgeführt.

Weiterhin wurde eine flüssig/flüssig-Extraktion nach Kutscher-Steudel durchgeführt. Hierfür wurden 200 mL Probe mit den internen Standards ϵ -Decalacton und C9-Methylester in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/L}$ Probe versetzt.

Diese Lösung wurde in den Extraktor gefüllt und mit 250 mL Lösungsmittelgemisch (Pentan:Dichlormethan = 4:1) überschichtet. Anschließend wurde 7 h bei 100°C extrahiert. Der resultierende Extrakt wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und an einer 30 cm Vigreux-Kolonne auf 1 mL eingengt. Diese Lösung wurde in ein GC-Vial gegeben und mittels GC-MS analysiert.

Substanz	Charakteristische Massen (m/z)
Furfural	95 , 96, 39
Furfurylalkohol	81
5-Methylfurfural	109 , 110, 53, 50
4-Ethylphenol	106.9
Guaiacol	109 , 124, 81, 53
4-Methylguaiacol	123 , 138, 67, 95
5-Hydroxymethylfurfural	97 , 126, 41, 69
4-Ethylguaiacol	137 , 152
<i>cis</i> -Whiskylacton	99 , 41, 71
5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd	126 , 43, 79, 109
<i>trans</i> -Whiskylacton	99 , 41, 71
2,6-Dimethoxyphenol	154 , 139
Eugenol	164 , 103, 77, 149, 131
Vanillin	151 , 152, 81, 109
Isoeugenol	164 , 77, 149, 91, 103
Acetovanillon	151 , 166, 123
δ -Decalacton	71
Ethylvanillat	151 , 196, 168, 123
2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol	194 , 91, 119
Syringaaldehyd	181 , 182, 111
2-Octanol (interner Standard)	45 , 55
Methylcinnamat (interner Standard)	131 , 103, 162
ϵ -Decalacton (interner Standard)	85 , 84, 113

Tabelle 4.2: Charakteristische Massenfragmente der verwendeten flüchtigen Aromastoffe; fettgedruckte Massen werden zur Quantifizierung eingesetzt.

4.1.11 Identifizierung und Quantifizierung der flüchtigen Stoffe nach SPE Aufarbeitung

Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgt über eine externe Kalibrierung von Referenzsubstanzen über die Retentionszeiten und spezifischen Massen, die in Tabelle 4.2 zusammengefasst sind. Die internen Standards, die für diese Kalibrierung verwendet wurden, sind 2-Octanol, Methylcinnamat und ϵ -Decalacton.

4.1.12 Identifizierung und Quantifizierung der flüchtigen Stoffe nach flüssig/flüssig-Extraktion

Die GC-MS Methode für die Proben, die mittels flüssig/flüssig-Extraktion aufgearbeitet wurden, entspricht einer halbquantitativen Methode. Hierbei wird über eine Einpunktkalibrierung die ungefähre Konzentration von flüchtigen Substanzen bestimmt.

Die internen Standards, die für diese Kalibrierung verwendet wurden, sind ϵ -Decalacton und ein C9-Methylester. ϵ -Decalacton wurde verwendet, da dieses auch in der SPE-Methode verwendet wurden. Somit sind die Ergebnisse in etwa vergleichbar mit denen der SPE-Methode.

Zu jeder Probe wurden die internen Standards in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/L}$ Probe vor der Aufarbeitung zugegeben. Bei der Auswertung wird die Fläche der internen Standards in das Verhältnis zur Fläche der zu untersuchenden Substanz gesetzt und mittels Dreisatz die Konzentration berechnet.

4.1.13 Kalibrierkurven der flüchtigen Stoffe für Weine und Modelllösungen

Für die Kalibrierung wurden die unter Kapitel 4.1.1 aufgeführten kommerziell erwerbenden Referenzsubstanzen nach folgendem Kalibrierschema zunächst in Dichlormethan gelöst und verdünnt. Diese Kalibrierung wurde für die Quantifizierung flüchtiger Holzinhaltsstoffe in Weinen und Modelllösungen verwendet.

Zunächst wurden die einzelnen Substanzen in einem 10 mL Kolben in den Mengen, die in Tabelle 4.3 angegeben sind, eingewogen. Aus diesen Stammlösungen wurden zwei unterschiedliche Mixtlösungen hergestellt. Zu einem einfachen Weißwein ohne Holzkontakt wurden diese Mixtlösungen in verschiedenen Verdünnun-

Verbindung	Einwaage [mg] in 10 mL	Konz. [mg/L] Standardmix	Std 0	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	WF	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8
Furfural	188	1128,0	22,6	56,4	112,8	225,6	375,6	564,0	751,2	1128,0	2256,0	4512,0
Furfurylalkohol	226	2260,0	45,2	113,0	226,0	452,0	752,6	1130,0	1505,2	2260,0	4520,0	9040,0
5-Methylfurfural	237	1422,0	28,4	71,1	142,2	284,4	473,5	711,0	947,1	1422,0	2844,0	5688,0
Phenylacetaldehyd	60	300,0	6,0	15,0	30,0	60,0	99,9	150,0	199,8	300,0	600,0	1200,0
Guaiacol	68	68,0	1,4	3,4	6,8	13,6	22,6	34,0	45,3	68,0	136,0	272,0
4-Ethylphenol	280	392,0	7,8	19,6	39,2	78,4	130,5	196,0	261,1	392,0	784,0	1568,0
4-Methylguaiacol	207	41,4	0,8	2,1	4,1	8,3	13,8	20,7	27,6	41,4	82,8	165,6
5-Hydroxymethyl-furfural	612	3672,0	73,4	183,6	367,2	734,4	1222,8	1836,0	2445,6	3672,0	7344,0	14688,0
4-Ethylguaiacol	243	145,8	2,9	7,3	14,6	29,2	48,6	72,9	97,1	145,8	291,6	583,2
cis-Whiskylacton	242	769,6	15,4	38,5	77,0	153,9	256,3	384,8	512,5	769,6	1539,1	3078,2
5-Acetoxyethyl-2-Furaldehyd	193	57,9	1,2	2,9	5,8	11,6	19,3	29,0	38,6	57,9	115,8	231,6
4-Vinylguaiacol	48	96,0	1,9	4,8	9,6	19,2	32,0	48,0	63,9	96,0	192,0	384,0
trans-Whiskylacton	242	682,4	13,6	34,1	68,2	136,5	227,3	341,2	454,5	682,4	1364,9	2729,8
2,6-Dimethoxyphenol	144	259,2	5,2	13,0	25,9	51,8	86,3	129,6	172,6	259,2	518,4	1036,8
Eugenol	169	338,0	6,8	16,9	33,8	67,6	112,6	169,0	225,1	338,0	676,0	1352,0
4-Propylguaiacol	218	54,5	1,1	2,7	5,5	10,9	18,1	27,3	36,3	54,5	109,0	218,0
β -Damascenon	216	864,0	17,3	43,2	86,4	172,8	287,7	432,0	575,4	864,0	1728,0	3456,0
Vanillin	189	1360,8	27,2	68,0	136,1	272,2	453,1	680,4	906,3	1360,8	2721,6	5443,2
Methyl Eugenol	208	83,2	1,7	4,2	8,3	16,6	27,7	41,6	55,4	83,2	166,4	332,8
Isoeugenol	218	218,0	4,4	10,9	21,8	43,6	72,6	109,0	145,2	218,0	436,0	872,0
γ -Nonalacton	139	139,0	2,8	7,0	13,9	27,8	46,3	69,5	92,6	139,0	278,0	556,0
Acetovanillon	37	222,0	4,4	11,1	22,2	44,4	73,9	111,0	147,9	222,0	444,0	888,0
δ -Decalacton	218	218,0	4,4	10,9	21,8	43,6	72,6	109,0	145,2	218,0	436,0	872,0
4-Hydroxy-3-methyl-acetophenon	177	1062,0	21,2	53,1	106,2	212,4	353,6	531,0	707,3	1062,0	2124,0	4248,0
Ethylvanillat	189	226,8	4,5	11,3	22,7	45,4	75,5	113,4	151,0	226,8	453,6	907,2
2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol	13	78,0	1,6	3,9	7,8	15,6	26,0	39,0	51,9	78,0	156,0	312,0
Syringaldehyd	206	1236,0	24,7	61,8	123,6	247,2	411,6	618,0	823,2	1236,0	2472,0	4944,0
Volumen	10 mL	5 mL	500 mL	200 mL	200 mL	200 mL	200 mL	200 mL	200 mL	200 mL	100 mL	100 mL

Tabelle 4.3: Konzentrationen der einzelnen Referenzsubstanzen in den Kalibrierlevels für die Quantifizierung der Holzinhaltstoffe in Weinen und Modelllösungen, wobei sich die Spaltennamen Std 0 - Std 8 auf die einzelnen Kalibrierlevel beziehen und der Spaltenname WF für die Konzentration der Wiederfindung steht.

Substanz	Wiederfindung in %
Furfural	107,8
Furfurylalkohol	97,5
5-Methylfurfural	122,2
Guaiacol	119,8
4-Ethylphenol	114,1
4-Methylguaiacol	114,3
5-Hydroxymethyl-furfural	79,6
4-Ethylguaiacol	80,6
<i>cis</i> -Whiskylacton	103,7
5-Acetoxyethyl-2-Furaldehyd	77,3
<i>trans</i> -Whiskylacton	103,4
2,6-Dimethoxyphenol	118,8
Eugenol	72,0
4-Propylguaiacol	75,6
β -Damascenon	88,2
Vanillin	87,8
Methyleugenol	84,9
Isoeugenol	68,6
Acetovanillon	79,3
δ -Decalacton	91,7
4-Hydroxy-3-methylacetophenon	104,1
Ethylvanillat	86,7
2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol	66,8
Syringaaldehyd	101,8

Tabelle 4.4: Wiederfindungsraten der GC-MS Messungen

gen zugegeben und anschließend ebenfalls mittels SPE und internen Standards aufgearbeitet und mittels GC-MS vermessen. Der Matrixwein wurde ebenfalls mittels SPE aufgearbeitet, mit GC-MS gemessen und als Blindwert abgezogen.

Für jede einzelne Substanz ergaben sich zwischen fünf und neun Kalibrierpunkte, welche anschließend für die Berechnung der Geradengleichung herangezogen wurden. Jede Kalibrierstufe wurde mindestens dreifach aufgearbeitet und vermessen.

Diese Kalibrierung wurde in regelmäßigen Abständen über Wiederfindungen geprüft, indem ebenfalls ein Wein ohne Holzkontakt mit einer bestimmten Konzentration der einzelnen Substanzen, die keiner der Standardkonzentrationen entspricht, aber im Kalibrierbereich liegt, versetzt und mittels SPE und internen Standards aufgearbeitet wird.

In Tabelle 4.3 ist diese Konzentration in der Spalte WF (Wiederfindung) eingetragen. Die genauen Wiederfindungswerte sind in Tabelle 4.4 angegeben. Im Mittel lag die Wiederfindung im Bereich zwischen 85 - 115 %.

Außerdem wurden die Nachweis-, die Erfassungs- und die Bestimmungsgrenzen der einzelnen Stoffe ermittelt. Die Werte hierzu sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Die Grenzen wurden nach DIN 32645 bestimmt.

4.2 HPLC

Begleitend zu der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen eines Projektes eine Masterarbeit durchgeführt und betreut, bei der die Analytik der Polyphenole optimiert wurde (Vogel 2010).

4.2.1 Chemikalien

Für die Aufarbeitung wurden Methanol für die HPLC (Firma Promochem, Middlesex, U.K.) und Ethanol 99.7-100% v/v (Firma VWR international Ltd, West Chester, PA, USA) verwendet. Alle eingesetzten Referenzsubstanzen waren in analytischer Reinheit verfügbar und wurden von den Firmen Sigma Aldrich und Roth bezogen und sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

4.2.2 Standardlösungen

Das Fließmittel A entspricht einem Phosphatpuffer. 3,4 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in 800 mL destilliertem Wasser gelöst, mit konzentrierter Phosphor-

Substanz	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/L}$]	Erfassungsgrenze [$\mu\text{g/L}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/L}$]
Furfural	0,85	2,7	2,82
Furfurylalkohol	1,93	3,96	6,38
5-Methylfurfural	2,11	4,21	7,28
Guaiacol	0,41	0,83	1,37
4-Ethylphenol	0,04	0,08	0,13
4-Methylguaiacol	3,48	6,96	11,5
5-Hydroxymethyl-furfural	0,13	0,26	0,44
4-Ethylguaiacol	0,17	0,23	0,4
cis-Whiskylacton	0,21	0,41	0,71
5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd	0,69	1,38	2,31
trans-Whiskylacton	0,53	1,05	1,75
2,6-Dimethoxyphenol	0,1	0,2	0,34
Eugenol	1,24	2,47	4,22
4-Propylguaiacol	2,26	4,52	7,71
β -Damascenon	0,1	0,19	0,32
Vanillin	0,17	0,34	0,57
Methyleugenol	0,3	0,59	0,99
Isoeugenol	0,44	0,87	1,46
Acetovanillon	0,32	0,65	1,1
δ -Decalacton	0,73	1,46	2,26
4-Hydroxy-3-methylacetophenon	0,69	1,37	2,4
Ethylvanillat	0,18	0,36	0,61
2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol	0,32	0,64	1,08
Syringaaldehyd	0,12	0,25	0,41

Tabelle 4.5: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen in $\mu\text{g/L}$ der GC-MS Messungen

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller
Gallussäure	149-91-7	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Protocatechusäure	99-50-3	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Protocatechualdehyd	139-85-5	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
4-Hydroxybenzaldehyd	123-08-0	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Vanillinsäure	121-34-6	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Kaffeesäure	331-39-5	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Vanillin	121-33-5	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Ferulasäure	537-98-4	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
4-Hydroxyzimtsäure	501-98-4	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
3-Hydroxybenzoesäure	99-06-9	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Syringasäure	530-57-4	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
(+)-Catechin	154-23-4	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sinapinaldehyd	4206-58-0	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Resveratrol	501-36-0	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Phlorizin	60-81-1	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Scopoletin	92-61-5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phloretin	60-82-2	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Rutin-Trihydrat	250249-75-3	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Kaempferol	520-18-3	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
4-Hydroxybenzoesäure	99-96-7	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Tryptophol	526-55-6	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Tyrosol	501-94-0	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland

Tabelle 4.6: Verwendete Referenzsubstanzen für die HPLC Methode

säure auf pH 2 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Anschließend erfolgt eine Vakuumfiltration mit regenerierter Cellulose, Porenweite 0,2 μm . Das Fließmittel B entspricht Methanol HPLC Grade 99,9 %.

Die weinähnliche Matrix wurde aus 5 g Glycerin, 5 g Weinsäure und 120 mL Ethanol aufgefüllt auf 1 L mit demineralisiertem Wasser hergestellt.

4.2.3 HPLC-DAD

Es wurde zur Methodenentwicklung und Analytik der Proben eine SPE-Vakuumkammer der Firma J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA und HPLC System der Firma Hitachi VWR (Tokio, Japan) verwendet.

Zur Auswahl der geeignetsten Säule standen die Reversed Phase (RP) SPE-Phasen Chromabond® Easy, Chromabond® HR-X, Chromabond® HR-P, Chromabond® C18-ec und Chromabond® C18-PAH und die Normal Phase (NP) Säule Chromabond® PA der Firma Macherey-Nagel zur Verfügung. Die SPE Säulen bestanden aus Polypropylen und waren mit 200 mg Phasenmaterial bestückt, bei einem Volumen von 3 mL.

Die Phase Chromabond® Easy besteht aus einem modifiziertem Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer mit einem schwachen Anionenaustauscher. Bei der Chromabond® HR-X Phase handelt es sich um ein hydrophobes Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer.

Das Phasenmaterial der Chromabond® HR-P besteht aus einem hochporösen Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer. Bei der Chromabond® C18-ec Phase besteht das Grundmaterial aus Silica, Octadecyl Phasen, endcapped. Die Chromabond® C18-PAH Phase besteht in der Basis aus Silica mit speziellen Octadecylmodifikationen, nicht endcapped. Bei der Chromabond® PA Phase besteht die Matrix aus Polyamid 6.

Das HPLC System bestand aus einem Hitachi VWR Elite LaChrom Hochleistungsflüssigchromatographen gekoppelt mit einem L-2455 Diodenarray Detektor, einem L-2220 Autosampler inklusive temperiertem 890-3017 Rack, einer L-2130 Pumpe und einem L-2350 Säulenofen. Die verwendete Vorsäule war eine Kieselgel RP-18 Säule der Firma Trentec (Rutesheim, Deutschland), bei der Trennsäule handelte es sich um eine RP-18 ODS Hypersil Säule (250 * 4,6 mm Refill) der Firma Trentec (Rutesheim, Deutschland). Das System wurde mittels der Software EZChrome Elite der Firma Hitachi gesteuert.

4.2.4 Chromatographische Bedingungen

- Fließmittel A Phosphatpuffer
- Fließmittel B Methanol
- Flussrate 1,2 mL/min
- Einspritzvolumen 50 µL
- Säulenofentemperatur 40°C
- Wellenlängen 230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm, 340 nm, 360 nm

4.2.5 Farbmessung

Für die Messung der Farbe wurde ein 933 UV/VIS Spektrophotometer der Firma Uvikon in Verbindung mit Makro Küvetten (2,5 mL; 12,5 x 12,5 x 45 mm) der Firma VWR verwendet. Es wurde bei den Wellenlängen 420 nm, 520 nm und 620 nm gemessen.

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	%Phosphatpuffer	%Methanol
0.00	1.20	95	5
4.00	1.20	95	5
32.00	1.20	80	20
40.00	1.20	80	20
55.00	1.20	45	55
65.00	1.20	45	55
69.00	1.20	10	90
73.00	1.20	10	90
76.00	1.20	95	5
88.00	1.20	95	5

Tabelle 4.7: Gradient der HPLC Methode

4.2.6 Probenvorbereitung für die Methodenentwicklung

Die Probenaufarbeitung wurde sowohl für die Kalibrierung als auch für die einzelnen Proben durchgeführt. Zur Konditionierung werden die Festphasenkartuschen zunächst mit 3 mL Methanol beschickt, anschließend mittels Vakuum trocken laufen gelassen und anschließend 3 mL einer 12% vol. Ethanol-Wassermischung aufgegeben.

Nach dem Aufsatz des Probenvorratsgefäßes wurden 50 mL Probe einpipettiert und mit 500 μ L des internen Standards 4-Methoxybenzoesäure versetzt. Die Flüssigkeit wurde über das Säulenmaterial geleitet und anschließend die Säule ca. 15 Minuten trocken laufen gelassen. Die Kartusche wurde zweifach mit 0,5 mL Methanol beschickt und das Eluat in einem Zentrifugenglas aufgefangen. Das Glas wurde für zwei Stunden zum Einengen in eine Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle gegeben. Der Rückstand wurde in 1 mL einer 12% vol. Ethanol-Wasserlösung aufgenommen und für 10 min in einem Ultraschallbad homogenisiert. Vor der Injektion in die HPLC wurde die Lösung über einen Membranfilter geleitet.

4.2.7 Mixstammlösung

Für die Methodenentwicklung wurde eine Mixstammlösung aus 15 Referenzsubstanzen erstellt. Hierfür wurden die Verbindungen in Konzentrationen von ca. 25 mg/L in 12 % vol. Ethanol gelöst und für die SPE-Aufarbeitung und die HPLC-Messungen verwendet. In Tabelle 4.8 sind die einzelnen Substanzen mit den jeweiligen Konzentrationen aufgeführt.

Substanz	in mg/L
Gallussäure	30,79
Protocatechusäure	20,85
Protocatechualdehyd	20,34
p-Hydroxybenzaldehyd	13,81
Vanillinsäure	41,29
Kaffeesäure	19,52
Vanillin	20,07
Ferulasäure	20,78
4-Hydroxyzimtsäure	13,63
Sorbinsäure	7,58
3-Hydroxybenzoesäure	19,80
Syringasäure	19,47
4-Allyl-2,6-dimethoxyphenol	21,16
Quercetin	2,03
Sinapinsäure	19,60

Tabelle 4.8: Konzentrationen der Substanzen in der Mixstammlösung

4.2.8 Kalibrierkurven der schwerflüchtigen Stoffe

Aufbauend auf der Methode von Del Álamo Sanza et al. (2004b) wurden die einzelnen Referenzsubstanzen zunächst in einem Ethanol/Wasser-Gemisch (12% vol.) gelöst und anschließend in einer weinähnlichen Matrix (siehe Abschnitt 4.2.2) in fünf aufsteigenden Konzentrationen angesetzt (siehe Tabelle 4.9). Die Aufarbeitung erfolgte über SPE mit Zugabe des internen Standards zu jedem einzelnen Kalibrierlevel und anschließender HPLC Messung. Die einzelnen Stoffe wurden anhand ihrer Retentionszeiten und den gemessenen Spektren identifiziert. Jede Lösung wurde dreifach aufgearbeitet und vermessen.

Die Kalibrierung wird in regelmäßigen Abständen über Wiederfindungen geprüft, indem ein Wein ohne Holzkontakt mit einer bestimmten Konzentration der einzelnen Substanzen versetzt wird und mittels SPE und internen Standards aufgearbeitet wird. Der Wein wird zusätzlich ohne Referenzsubstanzen vermessen und als Blindwert abgezogen.

4.2.9 Identifizierung und Quantifizierung der schwerflüchtigen Stoffe

Die einzelnen Stoffe wurden anhand der Retentionszeiten im Chromatogramm und der gemessenen Spektren identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung von Referenzsubstanzen (siehe Abschnitt 4.2.8). Durch die

Kalibrierlevel Substanz	L1	L2	L3 in mg/L	L4	L5
Gallussäure	2,51	10,02	25,05	40,08	50,1
Protocatechusäure	0,26	1,06	2,64	4,23	5,29
Protocatechualdehyd	0,25	0,98	2,46	3,93	4,91
p-Hydroxybenzaldehyd	0,24	0,95	2,36	3,78	4,73
Vanillinsäure	0,5	2,01	5,02	8,03	10,04
Kaffeesäure	0,6	2,39	5,97	9,56	11,95
Vanillin	0,26	1,03	2,56	4,1	5,13
Ferulasäure	0,25	0,99	2,47	3,95	4,93
4-Hydroxymzimtsäure	0,41	1,63	4,08	6,53	8,16
Sorbinsäure	0,49	1,97	4,93	7,89	9,86
3-Hydroxybenzoesäure	0,27	1,06	2,66	4,26	5,32
Syringasäure	0,25	0,99	2,46	3,94	4,93
(+)-Catechin	1,8	7,19	17,97	28,76	35,95
Sinapinaldehyd	0,24	0,97	2,42	3,87	4,83
Resveratrol	0,25	0,99	2,46	3,94	4,93
Phlorizin	0,23	0,94	2,34	3,74	4,68
Scopoletin	0,25	0,99	2,49	3,98	4,97
Phloretin	0,18	0,73	1,81	2,9	3,63
Rutin Trihydrat	0,37	1,47	3,68	5,88	7,36
Kaempferol	0,38	1,5	3,76	6,02	7,52
4-Hydroxybenzoesäure	0,27	1,08	2,7	4,33	5,41
Tryptophol	0,5	1,99	4,98	7,98	9,97
Tyrosol	0,76	3,04	7,59	12,15	15,19
Coniferaldehyd	0,52	2,09	5,22	7,84	10,44

Tabelle 4.9: Kalibrierlevel der einzelnen Standards für die HPLC Messungen

Verwendung eines internen Standards wurde die Aufarbeitung der einzelnen Proben überprüft.

4.2.10 Probenvorbereitung zur Farbmessung

Die Vorbereitung der Proben erfolgt je nach Weinart. Ist der Wein trüb, ist eine Membranfiltration durchzuführen. Rotweine werden 1:5 verdünnt, Weißweine werden direkt eingesetzt. Die Messungen erfolgen jeweils gegen einen Blindwert aus Wasser. Die Proben werden jeweils bei 420 nm (=E420), 520 nm (=E520) und 620 nm (=E620) gemessen. Berechnung der Farbintensität:

$$I = E420 + E520 + E620$$

Berechnung der Farbnuance:

$$N = E420/E520$$

Berechnung des Gelbanteils in % (%G):

$$\%G = E420/I * 100$$

Berechnung des Rotanteils in % (%R):

$$\%R = E520/I * 100$$

Berechnung des Blauanteils in % (%B):

$$\%B = E620/I * 100$$

4.3 NMR

4.3.1 Chemikalien

Für die Aufarbeitung wurden Methanol für die HPLC (Firma Promochem, Middlesex, U.K.), Ethanol 99.7-100% v/v (Firma VWR international Ltd, West Chester, PA, USA), Methanol D4, 99,8 Atom%D (Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 2,2,3,3-Tetradeutero-3-Trimethylsilylpropionsäure (TSP) (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Pufferherstellung wurde KH_2PO_4 für Analyse, Reinheit min. 99,5 % (Firma RdH Laborchemikalien GmbH + Co. KG, Seelze, Deutschland) eingesetzt.

4.3.2 Standardlösungen NMR

Für die Temperaturkalibrierung wurde eine Lösung, bestehend aus 600 μL 99,8% Methanol-d4 und 0,5 mM TSP zur Referenzierung verwendet. Die Lösung wurde in ein 5 mm Röhrchen überführt und abgeschmolzen. Zur Überprüfung der Wasserunterdrückung wurde eine Sucrose-Lösung, bestehend aus 2 mM Saccharose, 0,5 mM TSP und 2mM NaN_3 in 600 μL H_2O verwendet. Die Lösung wurde in ein 5 mm Röhrchen überführt und abgeschmolzen.

Der pH-Wert einer Probe spielt bei ^1H NMR Messungen eine entscheidende Rolle, da minimale Unterschiede zu chemischen Verschiebungen im Spektrum führen können. Diese Verschiebungen sind so gering wie möglich zu halten, um eine multivariate statistische Auswertung der Spektren zu ermöglichen. Daher wurde versucht, durch die Zugabe eines Phosphatpuffers die pH-Unterschiede in den einzelnen Weinproben zu minimieren. Außerdem enthält der Puffer die Referenzsubstanz TSP, mit der es möglich wird, die gemessenen Spektren auf einen Nullpunkt zu referenzieren. Für den Puffer wurden 13,61 g KH_2PO_4 mit 0,1 g TSP in einen 100 mL Kolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

4.3.3 NMR

Es wurde zur Methodenentwicklung und Aufarbeitung der Proben, die mittels SPE extrahiert wurden, eine SPE-Vakuumkammer der Firma J.T. Baker, Phillipsburg verwendet. Für die Proben, die mittels Mehrfach-Lösungsmittelunterdrückung untersucht wurden, wurde eine ISFET Mikro pH Elektrode (SENTRON MICRO) aus PEEK, mit einem Durchmesser von 3 mm, gekoppelt mit einem pH Meter (ARGUS), der Firma Sentron, Roden, Niederlande verwendet.

Zur Aufarbeitung wurden Festphasenkartuschen mit Polypropylen-Phase verwendet. Dabei handelte es sich um Chromabond[®] HR-P Kartuschen der Firma Macherey-Nagel mit 200 mg Festphasenmaterial (Sorbens) und einem Säulenvolumen von 3 mL.

Angelehnt an die Empfehlungen für die Standardisierung und Beschreibung von metabolischen Analysen der Standard Metabolic Reporting Structure (SMRS) Group (Lindon et al. 2005) sind das verwendete NMR Gerät, die verwendeten Methoden und die eingesetzten Datenbearbeitungen aufgeführt.

Die ^1H NMR Spektren wurden mit einem Bruker, Rheinstetten, Deutschland, 400 MHz Avance (AVIII) NMR Spektrometer aufgenommen, das mit der TOPSPIN 2.1 Patchlevel 5 Software ausgestattet war. Der verwendete Probenkopf war ein Bruker $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ invers Gradienten Shim Probenkopf mit ATMA, Z-Gradient und BTO 2000 Temperatureinheit. Es wurde außerdem ein BACS 60 Probengeber verwendet. Weiterhin wurde das Bruker Shimsystem BOSS II und eine BCU 05 Temperatureinheit für die Temperatureinstellung auf $\pm 0,1$ K eingesetzt.

4.3.4 Spektroskopische Bedingungen

Die Probenmessungen wurden nach einer Temperatur Äquilibration von 5 min gestartet. Bei jeder Messung wurden automatisch ATMA, Lock und die Topshim Routine gestartet. Nach der Messung wurden die ^1H NMR Spektren mittels der Bruker APK0.NOR processing Routine prozessiert, welche eine Fourier Transformation und eine Phasierung 0. Ordnung enthält. Dadurch, dass der Digitalfilter „baseopt“ eingesetzt wurde, war eine Basislinienkorrektur nicht notwendig. Die daraus resultierenden ^1H Spektren wurden ohne weitere Bearbeitung für die multivariate Statistik eingesetzt.

4.3.5 Probenvorbereitung für die Methodenentwicklung mittels SPE

Die Festphasenkartuschen wurden mit 3 mL Methanol und anschließend mit 3 mL Ethanol-Wasser Gemisch (13 % vol) konditioniert. Nach dem Aufsatz des Probenvorabsgefäßes wurden GC-Vials in die Kammer gestellt, 20 mL Probe einpipettiert, 2,22 mL Pufferlösung (siehe Abschnitt 4.3.2) hinzugefügt und verrührt. Die Flüssigkeit wurde über das Säulenmaterial geleitet. Nach dem Durchlaufen der Probe wurde das Säulenmaterial ca. 5 min trocken laufen gelassen. Die Kartusche wurde zweimal mit je 1 mL deuteriertem Methanol beschickt und das Eluat in die GC-Vials tropfen gelassen. Das Eluat wurde in 5 mm NMR-Röhrchen überführt und mittels ^1H NMR vermessen.

Jeden Tag wurde vor der eigentlichen Messung eine Temperaturkalibrierung (300,0 K) mit Methanol- d_4 (99,5 %) angelehnt an die Methode von Findeisen et al. (2007) durchgeführt, womit eine Temperaturstabilität zur Übertragbarkeit der einzelnen Messungen gewährleistet wird. Die neu eingestellte Temperatur wurde auf die Automation übertragen.

4.3.6 Probenvorbereitung für die Methodenentwicklung mit Mehrfach-Lösungsmittelunterdrückung

Die Probenvorbereitung für die NMR Messungen mit Mehrfach-Lösungsmittelunterdrückung erfolgt über eine Pufferzugabe zur Probe mit anschließender pH-Einstellung.

Hierfür werden 900 μL Probe in ein Schüttelgefäß zusammen mit 100 μL eines Phosphatpuffers gegeben. Das Gemisch wird geschüttelt und anschließend mit 0,1 N Natronlauge bzw. 0,1 N Salzsäure auf den pH-Wert einer vorher gemessenen Referenz auf 0,1 genau eingestellt. Da die Messung des pH-Werts nicht mit einer absolut messenden Elektrode erfolgte, sondern mit einer Vergleichselektrode, wurde nach jeder fünften Probe der pH-Wert der Referenz erneut gemessen und die nachfolgenden Proben auf den aktuell gemessenen Referenz-pH-Wert eingestellt.

Die Referenz wird von Bruker hergestellt und mittels NMR der pH-Wert überprüft. Dieser ist auch bei neuer Herstellung sehr gut mit den früheren Chargen vergleichbar. Der pH-Wert liegt bei 3,1. 600 μL dieser Lösung werden in ein 5 mm NMR-Röhrchen überführt und mittels der ^1H NMR Experimente wie unter Kapitel 4.3.8 beschrieben vermessen.

4.3.7 Temperaturkalibrierung

Jeden Tag wurde vor der eigentlichen Messung eine Temperaturkalibrierung (300,0 K) mit Methanol- d_4 (99,5 %) angelehnt an die Methode von Findeisen et al. (2007) durchgeführt, womit eine Temperaturstabilität zur Übertragbarkeit der einzelnen Messungen gewährleistet wird. Die neu eingestellte Temperatur wurde auf die Automation übertragen.

4.3.8 NMR Experimente

Die durchgeführten Experimente mit mehrfacher Lösungsmittelunterdrückung wurden in einer Schleife, dem sogenannten Loop, zusammengefasst. Somit wurde die Automation der Messungen vereinfacht. Jede Probe wurde vier Experimenten unterzogen.

Das erste Experiment ist eine einfache Bruker Standard zgpr Puls Sequenz, die dazu genutzt wurde, die Position des Wassersignals zu bestimmen. Aufbauend auf

diesem Experiment folgte eine Noesy Puls Sequenz, die den vorher gemessenen Wert des Wassersignals in die Lösungsmittelunterdrückung einbezieht. Die Position der Ethanol Signale wird aus diesen Werten berechnet. Somit ist eine genaue Einstrahlung auf die Lösungsmittelsignale vor dem eigentlichen Messpuls möglich. Darauf folgt ein zweidimensionales Jres Experiment, bei dem die Protonenmessungen gegeneinander aufgetragen werden. Dies ist hilfreich bei der Strukturaufklärung und der Zuordnung von Signalen. Als viertes Experiment läuft eine einfache zg30 Puls Sequenz, die zur Quantifizierung herangezogen werden kann. Die beiden letzten Experimente wurden durchgeführt, jedoch nicht zur Auswertung herangezogen, da die Methoden dazu noch nicht ausgereift waren. Die Auswertung dieser Daten kann aber zu einem späteren Zeitpunkt noch erfolgen.

zgpr Experiment

In das eindimensionale zgpr (**zero go pre**puration) Experiment war die Presaturation der Lösungsmittel integriert, daher der Experimentname zgpr. Über dieses Experiment wird der exakte O1 Wert des Wassersignals für jede Probe bestimmt und für die anschließenden Experimente weiterverwendet. Das Powerlevel betrug 58,97 db bei einem Wert von 4,704 ppm für die Wasserunterdrückung. Die Spektralbreite war auf 20,5187 ppm festgelegt und erstreckte sich von -5,4327 bis 15,0860 ppm. Es wurden 8 Scans nach 4 Dummyscans aufgenommen. Verwendet wurde ein Puls Delay von 4 s und eine Gesamtaufnahmezeit von 3,99 s bei einer Temperatur von 300 K. Die Receivergain hatte den Wert 1. Die Spektren der einzelnen Proben wurden auf das TSP Signal bei 0 ppm referenziert. In Abbildung 4.1 ist die Puls Sequenz des zgpr Experiments dargestellt.

Noesy Experiment

In das eindimensionale (1d) Noesy (noesy) Experiment war der Gradientenshimmkopf (Gradient Probe - gp), der für die optimale Einstellung des Magnetfeldes wichtig ist, und die Presaturation der Lösungsmittel mit einer Pulssequenz (ps) integriert, daher der Experimentname noesygps1d. Das Powerlevel betrug 58,85 db bei einem Wert von 4,704 ppm für die Wasserunterdrückung. Die Spektralbreite war auf 20,5187 ppm festgelegt und erstreckte sich von -5,4327 bis 15,0860 ppm. Es wurden 32 Scans nach 4 Dummyscans aufgenommen. Verwendet wurde ein Puls Delay von 4 s und eine Gesamtaufnahmezeit von 3,99 s bei einer Temperatur von 300 K. Die Spektren der einzelnen Proben wurden auf das TSP Signal bei

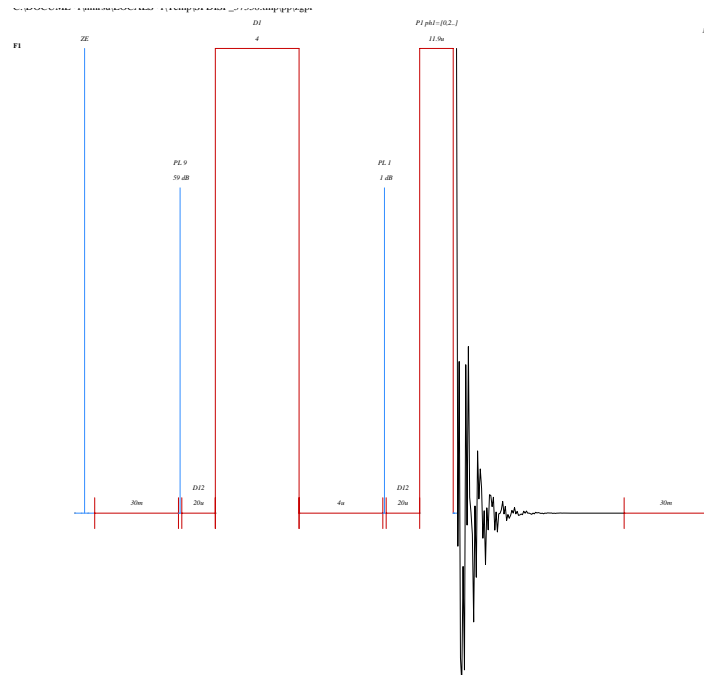


Abbildung 4.1: Puls Sequenz des zgpr Experiments

0 ppm referenziert. In Abbildung 4.2 ist die Puls Sequenz des Noesy Experiments dargestellt.

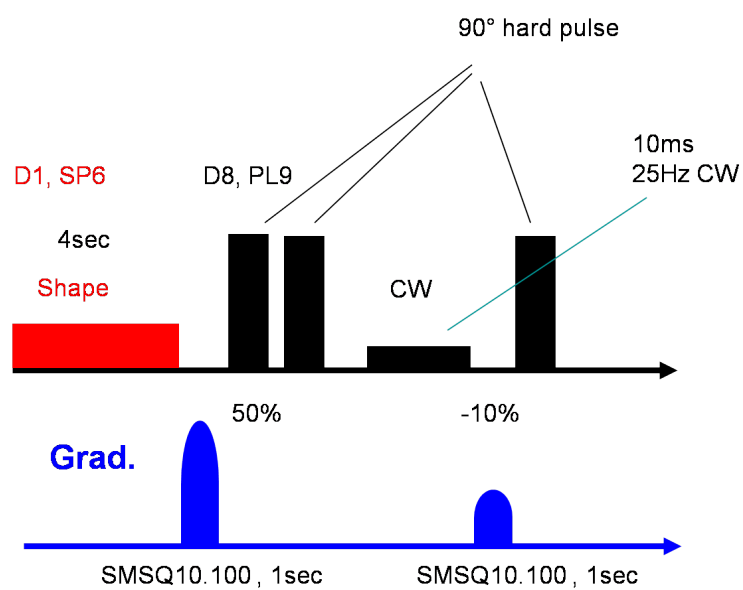


Abbildung 4.2: Puls Sequenz des Noesy Experiments

ppm für F1. Es wurden 4 Scans nach 16 Dummiscans aufgenommen. Verwendet wurde ein Puls Delay von 1 s und eine Gesamtaufnahmezeit von 0,61 s bei einer Temperatur von 300 K. Die Spektren der einzelnen Proben wurden auf das TSP Signal bei 0 ppm referenziert. In Abbildung 4.3 ist die Puls Sequenz des Jres Experiments dargestellt.

zg30 Experiment

Das eindimensionale zg30 (zero go 30 Grad Pulse) Experiment wurde zur Quantifizierung einzelner Peaks in die Experimentsequenz mitübernommen. Dieses Verfahren ist momentan noch in der Entwicklung, kann aber an den gemessenen Spektren auch im Nachhinein angewendet werden. Das Powerlevel betrug 58,97 db bei einem Wert von 4,704 ppm für die Wasserunterdrückung. Die Spektralbreite war auf 20,5187 ppm festgelegt und erstreckte sich von -5,4327 bis 15,0860 ppm. Es wurden 8 Scans nach 0 Dummiscans aufgenommen. Verwendet wurde ein Puls Delay von 5 s und eine Gesamtaufnahmezeit von 3,99 s bei einer Temperatur von 300 K. Die Receivergain hatte den Wert 1. Die Spektren der einzelnen Proben wurden auf das TSP Signal bei 0 ppm referenziert. In Abbildung 4.4 ist die Puls Sequenz des zg30 Experiments dargestellt.

4.4 Proben

4.4.1 Eichenholzchips und Eichenholzfässer für Modellversuche

Fässer

- Eichenfass medium getoastet, 20 Liter, deutsche Eiche, Herkunft Steigerwald, Hersteller: Müller
- Eichenfass medium getoastet, 20 Liter, deutsche Eiche, Herkunft Spessart, Hersteller: Aßmann

Eichenholzchips Firma Erbslöh

- Oakyvin, amerikanische Eiche, medium getoastet, mittlere Größe
- Oakyvin, französische Eiche, medium getoastet, mittlere Größe
- Oakyvin, deutsche Eiche, medium getoastet, mittlere Größe

Eichenholzchips Firma Schließmann

- deutsche Eiche, leicht getoastet, mittlere Größe
- deutsche Eiche, medium getoastet, mittlere Größe
- deutsche Eiche, stark getoastet, mittlere Größe
- amerikanische Eiche, medium getoastet, mittlere Größe

Eichenholzchips Firma J. Rettenmaier & Söhne GmbH und Co. KG

- Best Oak[®] non toasted (NT)

4.4.2 Weine

Die Weine, die zur Untersuchung flüchtiger und schwerflüchtiger Holzinhaltstoffe verwendet wurden, wurden von Forschungsanstalten in Deutschland, von Winzern aus der Region und aus dem Handel bezogen. Die genauen Angaben, sowie die Anzahl und Authentizität der Weine sind im Anhang unter Kapitel ?? zu finden.

4.5 Statistik

4.5.1 Statistik GC-MS und HPLC

Für die statistische Datenauswertung der GC-MS und HPLC Analysen wurden die Programme The Unscrambler[®] X, Version 10.1, von der Firma CAMO, SPSS statistics, Version 18, der Firma IBM[®], sowie WinSTAT[®] für Excel 2007, von der Firma Microsoft[®] verwendet.

Die Software Programme wurden für die Entwicklung und Berechnung von statistischen Modellen genutzt. Diese basieren auf der Principal Component Analysis (PCA), der Linear Discriminant Analysis (LDA) und der Partial Least Squares Analysis (PLS).

Für die statistischen Auswertungen wurden die Weine eingeteilt in authentische, B-authentische und unbekannte Proben. Innerhalb der authentischen Proben, die zur Modellbildung herangezogen wurden, wurde die Einteilung in Barrique Weine, Eichenholzchips Weine und Weine, die gleichzeitig mit Barrique und Chips hergestellt wurden, unternommen. Alle Daten wurden vor der statistischen Auswertung standardisiert und zentriert.

4.5.2 Statistik NMR

Die Auswertung der Ergebnisse der ^1H -NMR Daten erfolgte mittels der Bruker Software AMIX in der Version 3.6 sowie The Unscramber[®] X, Version 10.1, von der Firma CAMO. Die Weine wurden unterteilt in authentische Proben, B-authentische Proben und unbekannte Proben. Die authentischen Proben, die zur Modellbildung herangezogen wurden, wurden in Barrique Weine, Eichenholzchips Weine und Weine, die gleichzeitig mit Barrique und Chips hergestellt wurden, unterteilt.

Jedes Spektrum wurde in Teilstücke unterteilt. Hierfür wurde die Methode des simple rectangular bucketing verwendet. Es wurde der Ausschnitt zwischen **5 und 10 ppm** verwendet, da hier die meiste Trenninformation liegt. Die Breite jedes Teilstücks, auch als Buckets bezeichnet, liegt bei zwischen 0,02 und 0,04 ppm. Die Buckets wurden in einer Bucket Tabelle zusammengefasst, in der jede Zeile einem Spektrum (einer Probe) und jede Spalte einem Bucket entspricht (Neidig 2005).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war es, eine Methode zur Klassifizierung von unbekannten Weinen hinsichtlich des Holzzusatzes zu erarbeiten. Zunächst wurde das Hauptaugenmerk auf die flüchtigen Komponenten aus dem Holz im Wein gelegt. Allein aus diesen Ergebnissen war es möglich, statistische Modelle zu entwickeln, die eine Unterscheidung von Weinen, die im Barrique gelagert waren und solchen, die mit Eichenholzchips behandelt wurden zu ermöglichen. Um jedoch diese Methode überprüfen zu können, wurden zwei weitere Methoden in die Arbeit mit einbezogen, zum einen die Analyse der Weine mittels HPLC-DAD und Farbmessung und zum anderen die Untersuchung dieser Weine mittels ^1H -NMR Spektroskopie.

GC-MS Analytik

Das Hauptaugenmerk der gaschromatographischen Untersuchungen lag primär auf der Zuordnung von unbekannten Weinproben mittels eines statistischen Modells zur Gruppe „Barrique“ oder „Chips“.

Zum Aufbau des Modells wurden 138 authentische Weine (16 Barrique Weine und 122 Chips Weine) mittels GC-MS untersucht und anschließend die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Die monovariante Betrachtung der Ergebnisse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Weinen, die im Barrique Fass gelagert wurden und Weinen, die mit Eichenholzchips behandelt wurden. Die anschließend erfolgte Hauptkomponentenanalyse zeigte bezüglich der Trennung der Gruppen einen ersten Trend. Aus den Daten wurde ein Modell mittels linearer Diskriminanzanalyse aufgebaut. Es zeigte sich eine klare Trennung der beiden Gruppen.

Mit einer erweiterten Probenzahl an authentischen Weinen wurde ein PLS Modell erstellt. Die Ergebnisse aus 22 Barrique Weinen und 136 Chips Weinen zeigten ebenfalls eine eindeutige Trennung der beiden Gruppen. Diese beiden Modelle mit authentischen Proben wurden mit zehn Test Weinen mit bekannter Herstellung überprüft. Es wurden sowohl die Barrique Weine als auch die Chips Weine in beiden Modellen korrekt klassifiziert. Die Proben, die gleichzeitig im Barrique Fass mit Eichenholzchips behandelt wurden, konnten nicht eindeutig als Chips Weine erkannt werden.

Beide Modelle wurden anschließend zur Klassifizierung von Handelsproben herangezogen. Für die Zuordnung mittels linearer Diskriminanzanalyse wurden 47

Weine aus dem Handel untersucht. Von den 33 Barrique Weinen konnten 30 der korrekten Gruppe zugeordnet werden. Die 14 Chips Weine konnten alle richtig eingruppiert werden. Zur Klassifizierung mit dem Modell der PLS Analyse wurden 83 Weine aus dem Handel herangezogen. Von den 64 Barrique Proben konnten 59 der korrekten Gruppe zugeordnet werden und die 19 Chips Weine konnten alle richtig klassifiziert werden.

Somit ist es möglich, unbekannte Weine aus dem Handel mit den erstellten Modellen zu klassifizieren. Es ist jedoch zu beachten, dass eine Zuordnung eines unbekannten Weines zu einer Gruppe nicht als absolut gewertet werden kann, sondern das Verfahren als eine Screeningmethode zu betrachten ist. Die statistischen Modelle aus den GC-MS Analysen werden durch die Messung neuer authentischer Proben ständig aktualisiert.

Neben der Klassifizierung von Barrique und Chips Weinen wurden innerhalb der Arbeit in weiteren Versuchsreihen verschiedene Fragestellungen bearbeitet. Die Zusammenfassung der einzelnen Untersuchungen ist in der Reihenfolge der Kapitel dargestellt.

- Die erste Versuchsreihe befasste sich mit der Fragestellung, inwieweit sich eine künstliche Alterung der Eichenholzchips auf das Profil der flüchtigen Substanzen im Wein auswirkt. Dieses Experiment wurde durchgeführt, da Eichenholzchips meist nur in großen Mengen im Handel sind und somit die Gefahr besteht, dass die Chips über längere Zeit Licht und Luftsauerstoff ausgesetzt sind. Hierbei wurden sowohl ein Rot- als auch ein Weißwein verwendet und unterschiedliche Eichenholzchips eingesetzt. Die Auswertung dieses Versuchs ergab, dass bei den Rotweinen ein signifikanter Unterschied zwischen den frischen und den künstlichen gealterten Eichenholzchips erkennbar ist. Bei den Weißweinen waren diese Unterschiede auch erkennbar, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den Rotweinen. Es findet eine Veränderung der Zusammensetzung der flüchtigen Holzinhaltstoffe bei der künstlichen Alterung der Eichenholzchips statt.
- Bei der zweiten Versuchsreihe wurden zwei kleine Eichenholzfässer mit 20 L Volumen mit einem Modellwein gefüllt und zu verschiedenen Entnahmepunkten GC-MS Messungen durchgeführt, um Erkenntnisse über die ausschließlich aus dem Holz stammenden flüchtigen Verbindungen zu erlangen. Beide Fässer waren aus deutscher Eiche gefertigt, jedoch von zwei verschiedenen Herstellern. Ziel des Experiments war es herauszufinden, ob sich das Aromaprofil in einem Modellwein deutlich von dem eines handelsüblichen

Barrique Weins unterscheidet. Die Konzentrationen der Furanverbindungen HMF, 5-Methylfurfural und des aromatischen Aldehyds Syringaaldehyd in den Versuchs-Barrique Fässern lagen deutlich über denjenigen in den kommerziellen Weinen. Die Gehalte der Furanverbindung Furfural und des aromatischen Aldehyds Ethylvanillat lagen in den Versuchs-Barrique Fässern deutlich unter den Werten in den Barrique Weinen aus dem Handel.

- In der dritten Versuchsreihe wurde untersucht, welchen Einfluß Schwefel und Sauerstoff bezogen auf die flüchtigen Verbindungen in Weinen mit Eichenholzchips haben. Für dieses Experiment wurde eine Sorte Rotwein eingesetzt, die mit unterschiedlich getoasteten Chips (nicht getoastet, leicht getoastet, medium getoastet, stark getoastet) behandelt wurde. Die eine Hälfte der Weine wurde ausreichend geschwefelt, die andere Hälfte wurde nur gering geschwefelt. Diese Versuchsproben wurden zur Hälfte mit Sauerstoff angereichert. Ziel des Experiments war es, herauszufinden, ob die flüchtigen Weinhaltstoffe von den gegebenen drei äußeren Parametern (Toastungsgrad, Sauerstoff, Schwefelung) beeinflusst werden. Den größten Einfluss auf die flüchtigen Holzinhaltsstoffe hat der Parameter Toastungsgrad. Danach folgt der Parameter Sauerstoffeintrag und am wenigsten Einfluss hat der Parameter der Schwefelung. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich die Zusammensetzung der flüchtigen Holzinhaltsstoffe im Wein durch die Veränderung der drei Parameter Toastungsart, Sauerstoffeintrag und Schwefelung beeinflussen lässt.
- Die vierte Versuchsreihe befasste sich mit Eichenholzchipsextrakten, die in Modellweinen angesetzt wurden. Hierbei wurden zwei verschiedene Aufarbeitungsmöglichkeiten miteinander verglichen und versucht, bisher nicht berücksichtigte flüchtige Verbindungen zu bestimmen. Es hat sich gezeigt, dass die Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion der flüssig/flüssig-Extraktion vorzuziehen ist, da einerseits durch die Erwärmung der Probe Artefakte gebildet werden können und andererseits der Zeitaufwand und die Lösungsmittelmenge unverhältnismäßig über der der SPE-Aufarbeitung liegen. Es konnten einige bislang noch nicht verwendete Substanzen detektiert werden. Diese Verbindungen wurden jedoch nicht in die bestehende GC-MS Methode aufgenommen, entweder weil sie aufgrund fehlender Referenzverbindungen nicht quantifiziert werden konnten oder aufgrund der geringeren Flüchtigkeit ausschieden.

HPLC und Photometrische Analytik

Als zweite Methode neben der Analytik der flüchtigen Komponenten in Weinen mit Holzkontakt wurden auch die schwerflüchtigen Verbindungen mittels HPLC-DAD untersucht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde unabhängig davon versucht, ein statistisches Modell zur Unterscheidung von Barrique bzw. Chips Weinen zu erstellen. Zu Beginn wurde eine Methode mittels HPLC-DAD entwickelt, um die holzrelevanten phenolischen Inhaltsstoffe zu detektieren. Aufbauend darauf wurden Kalibrierungen mit 29 Reinsubstanzen erstellt und die gleichen authentischen Weine, wie in der GC-MS Analytik beschrieben, vermessen. Außerdem wurden diese Proben auch mittels FT-MIR vermessen und die Farbwerte mittels Photometer bestimmt. Aus diesen Daten wurde ein statistisches Modell entwickelt, welches eine Trennung von Chips Weinen und Barrique Weinen ermöglicht.

Es wurden zunächst alle gemessenen Parameter in der statistischen Auswertung verwendet und durch die Ausarbeitung verschiedener Modelle versucht, mit möglichst wenigen Variablen ein zuverlässig funktionierendes Modell zu entwickeln. Auch wurden die Messergebnisse der einzelnen Methoden getrennt voneinander betrachtet. Allerdings war das Resultat nicht zufriedenstellend. In der statistischen Auswertung konnte die Anzahl der Variablen schon auf sechs Substanzen reduziert werden, aber mit dem Modell, in dem nur die HPLC Daten verwendet wurden, konnten nur 91,5 % der ursprünglich gruppierten Fälle richtig klassifiziert werden. Das Signifikanzniveau von 5 % wurde also nicht erreicht.

Erst die Kombination der Ergebnisse der einzelnen Messmethoden konnte die Klassifizierung verbessern und optimieren. Die Werte aus den HPLC Messungen zusammen mit den Daten der Farbmessung zeigten in der statistischen Auswertung die gewünschten Resultate. Bei diesem Modell wurde die Zahl der Variablen auf 15 reduziert. Darin waren 11 HPLC Parameter und vier Farbwerte enthalten. Hiermit war es möglich, 98,9 % der ursprünglich gruppierten Fälle korrekt einzuordnen, das Ergebnis liegt damit deutlich im Signifikanzniveau. Es hat sich gezeigt, dass mit einem relativ geringen Aufwand eine ausreichend signifikante Trennung von Chips Weinen und Barrique Weinen möglich ist. Allerdings ist zu beachten, dass die Anzahl an authentischen Proben zu erweitern ist, um eine möglichst große Stichprobe aus der Grundgesamtheit zu erhalten und somit die Standardabweichungen in den einzelnen Messungen zu minimieren. Bislang wurden hauptsächlich regionale Proben untersucht. Interessant wird die Fragestellung, wenn man Weine aus verschiedenen Ländern untersucht, um festzustellen, wie diese sich in die bereits erstellten Modelle einpassen. Die Datenbank der authentischen Proben

ist immer erweiterbar, wodurch gewährleistet wird, dass die Jahrgangsunterschiede miteinbezogen werden und die so erstellten Modelle auf dem neuesten Stand sind.

NMR-Analytik

Die dritte Methode, die zur Entwicklung eines statistischen Modells zur Unterscheidung von Barrique Weinen und Chips Weinen beiträgt, ist die Untersuchung von Weinen mittels ^1H NMR Spektroskopie. Mit dieser Methode sollten die schwerflüchtigen holzrelevanten Verbindungen in Weinen mit Holzkontakt untersucht werden. Zu Beginn wurde versucht, eine Methode zu entwickeln, den Wein möglichst direkt vermessen. Aufgrund der großen Lösungsmittelsignale und zu geringer Signalintensitäten wurde eine Aufkonzentrierung erforderlich. Mittels Festphasenextraktion war es möglich, sowohl die Lösungsmittelkonzentration zu verringern als auch eine Erhöhung der Gehalte an phenolischen Verbindungen zu erreichen. Mit dieser Methode konnte nach der statistischen Auswertung eine Trennung der beiden Gruppen Barrique und Chips erreicht werden.

Da sich während dieser Zeit die Möglichkeit der mehrfachen Lösungsmittelunterdrückung im NMR-Spektrum weiterentwickelt hat, wurde von der Aufarbeitung mittels SPE abgesehen und der Fokus auf die Entwicklung einer einfacheren, besser reproduzierbaren Methode gelegt. Bei dieser Methode wird der Wein vor der ^1H NMR Analyse lediglich mit einem Puffer versehen und auf einen genau definierten pH-Wert eingestellt. Durch die Lösungsmittelunterdrückung wurde es möglich, die Signale, die sonst in den Flanken der Lösungsmittelsignale liegen, auszuwerten. Es ist keine weitere Aufkonzentrierung der Weine nötig, da die Signale im phenolischen Bereich zwischen 5 - 10 ppm sehr gut aufgelöst werden und für die statistische Auswertung so verwendet werden können. Außerdem hat sich gezeigt, dass durch einen Spektrenvergleich direkt Unterschiede in einzelnen Jahrgängen und in der Weinfarbe erkennbar sind.

Aufbauend auf den Spektren von authentischen Weinen, die mit dieser Methode aufgearbeitet wurden, wurden statistische Auswertungen durchgeführt. Die Hauptkomponentenanalyse, die ohne Gruppencodes arbeitet, trennt die Proben in Rot- bzw. Weißweine, was anzunehmen war, da die Farbe im phenolischen Bereich eine entscheidende Rolle spielt.

Mittels der PLS Analyse, die mit Gruppencodes arbeitet, war es möglich, die authentischen Proben in zwei Gruppen zu trennen. Auch die Klassifizierung der B-

authentischen Proben war signifikant möglich. Die Zuordnung von 64 Proben aus dem Handel zu einer der beiden Gruppen Barrique und Chips wurde durchgeführt. Es konnten alle 42 Barrique Weine richtig klassifiziert werden. Von den 10 Chips Weinen wurden ebenfalls alle korrekt zugeordnet. Bei den Weinen, die gleichzeitig im Barrique mit Eichenholzchips behandelt wurden konnten 10 von 12 Proben als Weine mit Chips Kontakt erkannt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der ^1H NMR Analytik und anschließender multivariater statistischer Auswertung eine Unterscheidung von Barrique Weinen und Chips Weinen möglich ist. Auch lassen sich mit dieser Methode Weine, die gleichzeitig im Barrique gelagert wurden und mit Eichenholzchips versetzt waren, als Chips Weine erkennen. Diese Methode ist jedoch als Screening Verfahren anzusehen, welches Hinweise auf die Herstellung von unbekannten Weinen gibt.

6 Literaturverzeichnis

- Aebi et al. 1957** AEBI, A. ; KAPOOR, A. L. ; BÜCHI, J.: Über Farn-Inhaltsstoffe IV. Die Struktur von Desaspidin. *Helvetica Chimica Acta* 40 (1957), S. 572 – 575
- Albano et al. 1978** ALBANO, C. ; DUNN III, W. ; EDLUND, U. ; JOHANSSON, E. ; NORDÉN, B. ; SJÖSTRÖM, M. ; WOLD, S.: Four Levels of Pattern Recognition. *Analytica Chimica Acta* 103 (1978), S. 429 – 443
- Alonso Borbalan et al. 2003** ALONSO BORBALAN, Á. M. ; ZORRO, L. ; GUILLÉN, D. A. ; GARCÍA BARROSO, C.: Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A* 1012 (2003), S. 31 – 38
- Amen-Chen et al. 2001** AMEN-CHEN, C. ; PAKDEL, H. ; ROY, C.: Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. *Bioresource Technology* 79 (2001), S. 277 – 299
- Anet und Bourn 1965** ANET, F. A. L. ; BOURN, A. J. R.: Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects. *Journal of the American Chemical Society* 87 (1965), S. 5250 – 5251
- Arapitsas et al. 2004** ARAPITSAS, P. ; ANTONOPOULOS, A. ; STEFANOU, E. ; DOURTOGLOU, V. G.: Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chemistry* 86 (2004), S. 563 – 570
- Arvanitoyannis et al. 1999** ARVANITOYANNIS, I. S. ; KATSOTA, M. N. ; PSARRA, E. P. ; SOUFLEROS, E. H. ; KALLITHRAKA, S.: Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends in Food Science and Technology* 10 (1999), S. 321 – 336
- Bauer 2003** BAUER, A.: *Entwicklung einer GC-MS Methode zur Analytik von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in getoasteten Eichenholzprodukten am Beispiel von Eichenholzchips und Barriquefässern*, Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit, 2003
- Becker und Beckert 2009** BECKER, Heinz G. O. (Hrsg.) ; BECKERT, Rainer (Hrsg.): *Organikum : organisch-chemisches Grundpraktikum*. 23., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Weinheim : Wiley-VCH-Verl., 2009

- Belton et al. 1996** BELTON, Peter S. ; DELGADILLO, Ivonne ; HOLMES, Elaine ; NICHOLLS, Andrew ; NICHOLSON, Jeremy K. ; SPRAUL, Manfred: Use of High-Field ^1H NMR Spectroscopy for the Analysis of Liquid Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996), S. 1483–1487
- Belton et al. 1997** BELTON, P. S. ; DELGAILLO, I. ; GIL, A. M. ; ROMA, P. ; CASUSCELLI, F. ; COLQUHOUN, I. J. ; DENNIS, M. J. ; SPRAUL, M.: High-field proton NMR studies of apple juices. *Magnetic Resonance in Chemistry* 35 (1997), S. S52 – S60
- Beyer 1991** BEYER, Hans ; WALTER, Wolfgang (Hrsg.): *Lehrbuch der organischen Chemie*. 22., überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart : Hirzel, 1991
- Billingham und Garcia-Trabajo 2001** BILLINGHAM, N. C. ; GARCIA-TRABAJO, P.: Physical Chemistry of a Phosphite Processing Stabilizer in Polypropylene. Part 1: Solubility. *Polymer Engineering and Science* 41 (2001), S. 417 – 425
- Blümich 2005** BLÜMICH, B.: *Essential NMR for Scientists and Engineers*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005
- Bloch 1946** BLOCH, F.: Nuclear Induction. *Physical Review* 70 (1946), S. 460 – 474
- Bozalongo et al. 2007** BOZALONGO, R. ; CARRILLO, J. D. ; FERNÁNDEZ TORROBA, M. Á. ; TENA, M. T.: Analysis of French and American oak chips with different toasting degrees by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1173 (2007), S. 10 – 17
- Bravo et al. 2006** BRAVO, M. N. ; SILVA, S. ; COELHO, A. V. ; VILAS BOAS, L. ; BRONZE, M. R.: Analysis of phenolic compounds in muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta* 563 (2006), S. 84 – 92
- Brescia et al. 2002** BRESCIA, M. A. ; CALDAROLA, V. ; GIGLIO, A. D. ; BENEDETTI, D. ; FANIZZI, F. P. ; SACCO, A.: Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Analytica Chimica Acta* 458 (2002), S. 177 – 186
- Bro und Smilde 2003** BRO, R. ; SMILDE, A. K.: Centering and scaling in component analysis. *Journal of Chemometrics* 17 (2003), S. 16 – 33

- Brown et al. 2006** BROWN, R. C. ; SEFTON, M. A. ; TAYLOR, D. K. ; ELSEY, G. M.: An odour detection threshold determination of all four possible stereoisomers of oak lactone in a white and a red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12 (2006), S. 115 – 118
- Büchi et al. 1957** BÜCHI, J. ; AEBI, A. ; KAPOOR, A.: Composition of fern roots. *Scientia Pharmaceutica* 25 (1957), S. 248 – 272
- Butticaz und Rawyler 2007** BUTTICAZ, S. ; RAWYLER, A.: Différenciation analytique des vins élevés en fût de chêne et macérés avec des copeaux de chêne. *Revue suisse Viticulture Arboriculture Horticulture* 39 (2007), S. 367 – 373
- Cadahía et al. 2001** CADAHÍA, E. ; MUNOZ, L. ; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; GARCIA-VALLEJO, M.-C.: Changes in Low Molecular Weight Phenolic Compounds in Spanish, French, and American Oak Woods during Natural Seasoning and Toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001), S. 1790 – 1798
- Cadahía et al. 2003** CADAHÍA, E. ; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; JALLOCHA, J.: Volatile Compounds in Spanish, French, and American Oak Woods after Natural Seasoning and Toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003), S. 5923 – 5932
- Cadahía et al. 2009** CADAHÍA, E. ; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; SANZ, M. ; POVEDA, P. ; COLIO, J.: Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. *Food Chemistry* 115 (2009), S. 639 – 649
- Campo et al. 2007** CAMPO, E. ; CACHO, J. ; FERREIRA, V.: Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters: Assessment of their occurrence and importance in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A* 1140 (2007), S. 180 – 188
- Carver und Slichter 1953** CARVER, T. R. ; SLICHTER, C. P.: Polarization of Nuclear Spins in Metals. *Physical Review* 92 (1953), S. 212 – 213
- Cejudo-Bastante et al. 2011a** CEJUDO-BASTANTE, M. J. ; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. ; CASTRO-VÁSQUEZ, I. ; PÉREZ-COELLO, M. S.: Hyperoxygenation and Bottle Storage of Chardonnay White Wines: Effects on Color-Related Phenolics, Volatile Composition, and Sensory Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2011), S. 4171 – 4182

- Cejudo-Bastante et al. 2011b** CEJUDO-BASTANTE, M. J. ; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. ; PÉREZ-COELLO, M. S.: Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part II: Merlot wines. *Food Chemistry* 124 (2011), S. 738 – 748
- Chatonnet et al. 1999** CHATONNET, P. ; CUTZACH, I. ; PONS, M. ; DUBOURDIEU, D.: Monitoring Toasting Intensity of Barrels by Chromatographic Analysis of Volatile Compounds from Toasted Oak Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999), S. 4310 – 4318
- Chatonnet 1999** CHATONNET, P.: Discrimination and Control of Toasting Intensity and Quality of Oak Wood Barrels. *American Journal of Enology and Viticulture* 50 (1999), S. 479 – 494
- Clarke und Bakker 2004** CLARKE, R. J. ; BAKKER, J.: *Wine Flavour Chemistry*. 1st edition. Oxford : Wiley-Blackwell, 2004
- Cloarec et al. 2005a** CLOAREC, O. ; DUMAS, M.-E. ; CRAIG, A. ; BARTON, R. H. ; TRYGG, J. ; HUDSON, J. ; BLANCHER, C. ; GAUGUIER, D. ; LINDON, J. C. ; HOLMES, E. ; NICHOLSON, J.: Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic ^1H NMR Data Sets. *Analytical Chemistry* 77 (2005), S. 1282 – 1289
- Cloarec et al. 2005b** CLOAREC, O. ; DUMAS, M. E. ; TRYGG, J. ; CRAIG, A. ; BARTON, R. H. ; LINDON, J. C. ; NICHOLSON, J. K. ; HOLMES, E.: Evaluation of the Orthogonal Projection on Latent Structure Model Limitations Caused by Chemical Shift Variability and Improved Visualization of Biomarker Changes in ^1H NMR Spectroscopic Metabonomic Studies. *Analytical Chemistry* 77 (2005), S. 517 – 526
- Constantinou et al. 2005** CONSTANTINO, M. A. ; PAPAKONSTANTINO, E. ; SPRAUL, M. ; SEVASTIADOU, S. ; COSTALOS, C. ; KOUPPARIS, M. A. ; SHULPIS, K. ; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. ; MIKROS, E.: ^1H NMR-based metabonomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine. *Analytica Chimica Acta* 542 (2005), S. 169 – 177
- Cuny et al. 2008** CUNY, M. ; VIGNEAU, E. ; LE GALL, G. ; COLQUHOUN, I. ; LEES, M. ; RUTLEDGE, D. N.: Fruit juice authentication by ^1H NMR spectroscopy in combination with different chemometric tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (2008), S. 419 – 427

- Cutzach et al. 1997** CUTZACH, I. ; CHATONNET, P. ; HENRY, R. ; DUBOURDIEU, D.: Identification of Volatile Compounds with a „Toasty“ Aroma in Heated Oak Used in Barrelmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997), S. 2217 – 2224
- Cutzach et al. 1999** CUTZACH, I. ; CHATONNET, P. ; HENRY, R. ; DUBOURDIEU, D.: Identifying New Volatile Compounds in Toasted Oak. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999), S. 1663 – 1667
- Daszykowski et al. 2007** DASZYKOWKI, M. ; KACZMAREK, K. ; VANDER HEYDEN, Y. ; WALCZAK, B.: Robust statistics in data analysis - A review basic concepts. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 85 (2007), S. 203 – 219
- Daszykowski et al. 2003** DASZYKOWSKI, M. ; WALCZAK, B. ; MASSART, D. L.: Projection methods in chemistry. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 65 (2003), S. 97 – 112
- Defernez und Colquhoun 2003** DEFERNEZ, M. ; COLQUHOUN, I. J.: Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra. *Phytochemistry* 62 (2003), S. 1009 – 1017
- Del Álamo et al. 2008** DEL ÁLAMO, M. ; NEVARES, I. ; GALLEGU, L. ; MARTIN, C. ; MERINO, S.: Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves, and barrels. *Analytica Chimica Acta* 621 (2008), S. 86 – 99
- Del Álamo Sanza et al. 2004a** DEL ÁLAMO SANZA, M. ; DOMÍNGUEZ, I. N. ; MERINO, S. G.: Influence of different aging systems and oak woods on aged wine color and anthocyanin composition. *European Food Research and Technology* 219 (2004), S. 124 – 132
- Del Álamo Sanza et al. 2004b** DEL ÁLAMO SANZA, M. ; NEVARES DOMÍNGUEZ, I. ; CÁRCEL CÁRCEL, L. M. ; NAVAS GRACIA, L.: Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004), S. 229 – 237
- Del Álamo Sanza und Domínguez 2006** DEL ÁLAMO SANZA, M. ; DOMÍNGUEZ, I. N.: Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods: Anthocyanin composition. *Analytica Chimica Acta* 563 (2006), S. 255 – 263

- Díaz-Maroto et al. 2008** DÍAZ-MAROTO, M. C. ; GUCHU, E. ; CASTRO-VÁZQUEZ, L. ; TORRES, C. de ; PÉREZ-COELLO, M. S.: Aroma-active compounds of American, French, Hungarian and Russian oak woods, studied by GC-MS and GC-O. *Flavour and Fragrance Journal* 23 (2008), S. 93 – 98
- Dinsmoor Webb 1974** DINSMOOR WEBB, A.: *Chemistry of Winemaking*. Bd. 137: *Advances in Chemistry Series*. Washington DC : American Chemical Society, 1974
- Doussot et al. 2002** DOUSSOT, F. ; DE JESO, B. ; QUIDEAU, S. ; PARDON, P.: Extractives Content in Cooperage Oak Wood during Natural Seasoning and Toasting; Influence of Tree Species, Geographic Location, and Single-Tree Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002), S. 5955 – 5961
- Duarte et al. 2002** DUARTE, I. ; BARROS, A. ; BELTON, P. S. ; RIGHELATO, R. ; SPRAUL, M. ; HUMPFER, E. ; GIL, A. M.: High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002), S. 2475 – 2481
- Eißner 2006** EISSNER, J.: *Differenzierung mit Eichenholz aromatisierter Weine mittels multivariater Datenanalyse des Aromaprofils*, Hochschule Aalen - Technik und Wirtschaft, Diplomarbeit, 2006
- El-Deredy 1997** EL-DEREDY, W.: Pattern Recognition Approach in Biomedical and Clinical Magnetic Resonance Spectroscopy: A Review. *NMR in Biomedicine* 10 (1997), S. 99 – 124
- Eriksson et al. 2001** ERIKSSON, L. ; JOHANSSON, E. ; KETTANEH-WOLD, N. ; WOLD, S.: *Multi- and Megavariate Data Analysis - Principles and Applications*. Umetrics Academy, Umeå, Schweden, 2001
- Esbensen 2009** ESBENSEN, K. H.: *Multivariate Data Analysis - In Practice 5th Edition (reprint) An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*. Oslo : Camo Software AS., 2009
- Fernández de Simón et al. 2003a** FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; CADAHÍA, E. ; JALOCHA, J.: Volatile Compounds in a Spanish Red Wine Aged in Barrels Made of Spanish, French, and American Oak Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003), S. 7671 – 7678
- Fernández de Simón et al. 2003b** FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; HERNÁNDEZ, T. ; CADAHÍA, E. ; DUEÑAS, M. ; ESTRELLA, I.: Phenolic compounds in a Spanish

- red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology* 216 (2003), S. 150 – 156
- Fernández de Simón et al. 2006** FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; CADAHÍA, E. ; HERNÁNDEZ, T. ; ESTRELLA, I.: Evolution of oak-related volatile compounds in a Spanish red wine during 2 years bottled, after aging in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *Analytica Chimica Acta* 563 (2006), S. 198 – 203
- Fernández de Simón et al. 2009** FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; ESTERUELAS, E. ; MUNOZ, A. M. ; CADAHÍA, E. ; SANZ, M.: Volatile Compounds in Acacia, Chestnut, Cherry, Ash, and Oak Woods, with a View to Their Use in Cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009), S. 3217 – 3227
- Fernández de Simón et al. 2010** FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; CADAHÍA, E. ; DEL ÁLAMO, M. ; NEVARES, I.: Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them. *Analytica Chimica Acta* 660 (2010), S. 211 – 220
- Ferrari et al. 2011** FERRARI, E. ; FOCA, G. ; VIGNALI, M. ; TASSI, L. ; ULRICI, A.: Adulteration of the anthocyanin content of red wines: Perspectives for authentication by Fourier Transform-Near Infrared and ^1H NMR spectroscopies. *Analytica Chimica Acta* 701 (2011), S. 139 – 151
- Ferreira et al. 2004a** FERREIRA, V. ; CULLERÉ, L. ; LÓPEZ, R. ; CACHO, J.: Determination of important odor-active aldehydes of wine through gas chromatography-mass spectrometry of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge for selective isolation. *Journal of Chromatography A* 1028 (2004), S. 339 – 345
- Ferreira et al. 2004b** FERREIRA, V. ; JARAUTA, I. ; ORTEGA, L. ; CACHO, J.: Simple strategy for the optimization of solid-phase extraction procedures through the use of solid-liquid distribution coefficients: Application to the determination of aliphatic lactones in wine. *Journal of Chromatography A* 1025 (2004), S. 147 – 156
- Ferreira et al. 2006** FERREIRA, V. ; JARAUTA, I. ; CACHO, J.: Physicochemical Model To Interpret the Kinetics of Aroma Extraction during Wine Aging in Wood. Model Limitations Suggest the Necessary Existence of Biochemical Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006), S. 3047 – 3054

- Findeisen et al. 2007** FINDEISEN, M. ; BRAND, T. ; BERGER, S.: A 1 -NMR thermometer suitable for cryoprobes. *Magnetic Resonance in Chemistry* 45 (2007), S. 175–178
- Fisher 1936** FISHER, R. A.: The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics* 7 (1936), S. 179–188
- Flak et al. 2002** FLAK, W. ; TSCHIEK, G. ; KRIZAN, R. ; SPANITZ, F. ; WEISS, G.: Der Einfluss von Eichenholzchips auf das Aromaprofil und die sensorische Qualität von Rotwein. *Mitteilungen Klosterneuburg* 52 (2002), S. 150 – 164
- Flak et al. 2004** FLAK, W. ; TSCHIEK, G. ; KRIZAN, R. ; SPANITZ, F. ; WEISS, G.: Der Einfluss von Eichenholz auf das Aromaprofil und die sensorischen Eigenschaften von Weißwein. *Mitteilungen Klosterneuburg* 54 (2004), S. 133 – 143
- Flury und Riedwyl 1983** FLURY, B. ; RIEDWYL, H.: *Angewandte multivariate Statistik. Computergestützte Analyse mehrdimensionaler Daten*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1983
- Fragaki et al. 2005** FRAGAKI, G. ; SPYROS, A. ; SIRAGAKIS, G. ; SALIVARAS, E. ; DAIS, P.: Detection of Extra Virgin Olive Oil Adulteration with Lampante Olive Oil and Refined Olive Oil Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Statistical Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005), S. 2810 – 2816
- Frangipane et al. 2007** FRANGIPANE, M. T. ; DE SANTIS, D. ; CECCARELLI, A.: Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chemistry* 103 (2007), S. 46 – 54
- Friebolin 2006** FRIEBOLIN, H.: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*. Wiley-VCH, Weinheim, 2006
- García-Jares und Médina 1993** GARCÍA-JARES, C. ; MÉDINA, B.: Research on White and Red Wine Blending in the Production of Rosé Wines by Means of the Partial Least Squares Method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63 (1993), S. 349 – 354
- García-Parrilla et al. 1997** GARCÍA-PARRILLA, M. C. ; GONZÁLEZ, G. A. ; HEREDIA, F. J. ; TRONCOSO, A. M.: Differentiation of Wine Vinegars Based on Phenolic Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997), S. 3487 – 3492

- Garde-Cerdán und Ancín-Azpilicueta 2006** GARDE-CERDÁN, T. ; ANCÍN-AZPILICUETA, C.: Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science and Technology* 17 (2006), S. 438 – 447
- Gächter und Müller 1990** GÄCHTER, R. ; MÜLLER, H.: *Plastics Additives Handbook - Stabilizers, Processing Aids, Plasticizers, Fillers, Reinforcements, Colorants for Thermoplastics*. 3rd ed. Hanser, Munich 1990
- Gil et al. 2003** GIL, A. M. ; DUARTE, I. F. ; GODEJOHANN, M. ; BRAUMANN, U. ; MARASCHIN, M. ; SPRAUL, M.: Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 488 (2003), S. 35 – 51
- Glabasnia und Hofmann 2007** GLABASNIA, A. ; HOFMANN, T.: Identification and Sensory Evaluation of Dehydro- and Deoxy-ellagitannins Formed upon Toasting of Oak Wood (*Quercus alba* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007), S. 4109 – 4118
- Günther 1983** GÜNTHER, H.: *NMR-Spektroskopie Eine Einführung in die Protonenresonanzspektroskopie und ihre Anwendungen in der Chemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1983
- González-Rodríguez et al. 2003** GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J. ; PÉREZ-JUAN, P. ; CASTRO, M. D. Luque de: Extraction of Wood Compounds by Use of Subcritical Fluids. *Chromatographia* 57 (2003), S. 363 – 368
- Guchu et al. 2006** GUCHU, E. ; DÍAZ-MAROTO, M. C. ; PÉREZ-COELLO, M. S. ; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A. ; IBÁÑEZ, M. D. C.: Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chips. *Food Chemistry* 99 (2006), S. 350 – 359
- Guichard et al. 1995** GUICHARD, E. ; FOURNIER, N. ; MASSON, G. ; PUECH, J.-L.: Stereoisomers of β -Methyl- γ -Octalactone. I. Quantification in Brandies as a Function of Wood Origin and Treatment of the Barrel. *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (1995), S. 419 – 423
- Guéron et al. 1991** GUÉRON, M. ; PLATEAU, P. ; DECORPS, M.: Solvent Signal Suppression in NMR. *Progress in NMR Spectroscopy* 23 (1991), S. 135–209

- Hagerman und Butler 1991** HAGERMAN, A. E. ; BUTLER, L. G.: *Tannins and lignins*, In: Rosenthal, G. A. and Berenbaum, M. R. (eds.), *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. Bd. 1. S. 355 – 388, Academic Press, Inc., San Diego 1991
- Hale et al. 1999** HALE, M. D. ; MCCAFFERTY, K. ; LARMIE, E. ; NEWTON, J. ; SWAN, J. S.: The Influence of Oak Seasoning and Toasting Parameters on the Composition and Quality of Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 50 (1999), S. 495 – 502
- Haslam 2007** HASLAM, E.: Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68 (2007), S. 2713 – 2721
- Hayasaka et al. 2007** HAYASAKA, Y. ; WILKINSON, K. L. ; ELSEY, G. M. ; RAUNKJAER, M. ; SEFTON, M. A.: Identification of Natural Oak Lactone Precursors in Extracts of American and French Oak Woods by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007), S. 9195 – 9201
- Herjavec et al. 2007** HERJAVEC, S. ; JEROMEL, A. ; ORLIC, S. ; KOZINA, B.: Changes in volatile composition and sensory properties of vugava wines aged in croatia oak barrels. *Journal of Central European Agriculture* 8 (2007), S. 195 – 204
- Hervé du Penhoat et al. 1991a** HERVÉ DU PENHOAT, C. G. M. ; MICHON, V. M. F. ; PENG, S. ; VIRIOT, C. ; SCALBERT, A. ; GAGE, D.: Structural elucidation of new dimeric ellagitannins from *Quercus robur* L. Roburins A-E. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 7 (1991), S. 1653 – 1660
- Hervé du Penhoat et al. 1991b** HERVÉ DU PENHOAT, C. L. M. ; MICHON, V. M. F. ; OHASSAN, A. ; PENG, S. ; SCALBERT, A. ; GAGE, D.: Roburin A, a Dimeric Ellagitannin from Heartwood of *Quercus Robur*. *Phytochemistry* 30 (1991), S. 329 – 332
- Herzog und Messerschmidt 1995** HERZOG, W.-D. ; MESSERSCHMIDT, M.: *NMR-Spektroskopie f151 - 163r Anwender*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1995
- Ho et al. 1999** HO, P. ; HOGG, T. A. ; SILVA, M. C. M.: Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food Chemistry* 64 (1999), S. 115 – 122

- Hollywood et al. 2006** HOLLYWOOD, K. ; BRISON, D. R. ; GOODACRE, R.: Metabolomics: Current technologies and future trends. *Proteomics* 6 (2006), S. 4716 – 4723
- Holmes et al. 2000** HOLMES, E. ; NICHOLLS, A. W. ; LINDON, J. C. ; CONNOR, S. C. ; CONNELLY, J. C. ; HASELDEN, J. N. ; DAMMENT, S. J. P. ; SPRAUL, M. ; NEIDIG, P. ; NICHOLSON, J. K.: Chemometric Models for Toxicity Classification Based on NMR Spectra of Biofluids. *Chemical Research in Toxicology* 13 (2000), S. 471 – 478
- Hore 1989** HORE, P. J.: Solvent suppression. *Methods in Enzymology* 176 (1989), S. 64 – 77
- Hotelling 1933** HOTELLING, H.: Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* 24 (1933), S. 417 – 441 und 498 – 520
- Hoult 1976** HOULT, D. I.: Solvent Peak Saturation with Single Phase and Quadrature Fourier Transformation. *Journal of Magnetic Resonance* 21 (1976), S. 337 – 347
- Hübschmann 1996** HÜBSCHMANN, H.-J.: *Handbuch der GC/MS. Grundlagen und Anwendungen*. Wiley-VCH, 1996
- Jackson 1991** JACKSON, J. E.: *A User's Guide to Principal Components*. John Wiley, New York, 1991
- Jindra und Gallander 1987** JINDRA, J. A. ; GALLANDER, J. F.: Effect of American and French Oak Barrels on the Phenolic Composition and Sensory Quality of Seyval blanc Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 38 (1987), S. 133 – 138
- Johnson 1989** JOHNSON, H.: *Vintage: The story of wine*. First edition. Simon & Schuster, 1989
- Jordão et al. 2006** JORDÃO, A. M. ; RICARDO-DA-SILVA, J. M. ; LAUREANO, O. ; ADAMS, A. ; DEMYTTEAERE, J. ; VERHÉ, R. ; DE KIMPE, N.: Volatile composition analysis by solid-phase microextraction applied to oak wood used in cooperage (*Quercus pyrenaica* and *Quercus petraea*): effect of botanical species and toasting process. *Journal of Wood Science* 52 (2006), S. 514 – 521

- Kirk und Farrell 1987** KIRK, T. K. ; FARRELL, R. L.: Enzymatic "Combustion" : The Microbial Degradation of Lignin. *Annual Reviews of Microbiology* 41 (1987), S. 465 – 505
- Koseki et al. 1996** KOSEKI, Takuya ; ITO, Yasuou ; FURUSE, Shinji ; ITO, Kiyoshi ; IWANO, Kimio: Conversion of ferulic acid into 4-vinylguaiacol, vanillin and vanillic acid in model solutions of shochu. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82 (1996), S. 46 – 50
- Košir und Kidrič 2002** KOŠIR, I. J. ; KIDRIČ, J.: Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Analytica Chimica Acta* 458 (2002), S. 77 – 84
- Koussissi et al. 2009** KOUSSISSI, E. ; DOURTOGLOU, V.G. ; AGELOUSSIS, G. ; PARASKEVOPOULOS, Y. ; DOURTOGLOU, T. ; PATERSON, A. ; CHATZILAZAROU, A.: Influence of toasting of oak chips on red wine maturation from sensory and gas chromatographic headspace analysis. *Food Chemistry* 114 (2009), S. 1503 – 1509
- Kowalski und Bender 1972** KOWALSKI, B. R. ; BENDER, C. F.: Pattern Recognition. A Powerful Approach to Interpreting Chemical Data. *Journal of the American Chemical Society* 94 (1972), S. 5632 – 5639
- Krishnan et al. 2005** KRISHNAN, P. ; KRUGER, N. J. ; RATCLIFFE, R. G.: Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany* 56 (2005), S. 255 – 265
- Lay et al. 2006** LAY, J. O. ; BORGMANN, S. ; LIYANAGE, R. ; WILKINS, C. L.: Problems with the "omics". *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006), S. 1046 – 1056
- Le Gall et al. 2001** LE GALL, G. ; PUAUD, M. ; COLQUHOUN, I. J.: Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001), S. 580 – 588
- Lee et al. 2009** LEE, J.-E. ; HWANG, G.-S. ; VAN DEN BERG, F. ; LEE, C.-H. ; HONG, Y.-S.: Evidence of vintage effects on grape wines using ^1H NMR-based metabolomic study. *Analytica Chimica Acta* 648 (2009), S. 71 – 76

- Lee und Noble 2003** LEE, S.-J. ; NOBLE, A. C.: Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003), S. 8036 – 8044
- Levitt 2001** LEVITT, M. H.: *SPIN DYNAMICS Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons, LTD, Chichester 2001
- Lindon et al. 2001** LINDON, J. C. ; HOLMES, E. ; NICHOLSON, J. K.: Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 39 (2001), S. 1 – 40
- Lindon et al. 2003** LINDON, J. C. ; HOLMES, E. ; NICHOLSON, J. K.: So What's the Deal with Metabonomics? *Analytical Chemistry* 75 (2003), S. 384A – 391A
- Lindon et al. 2005** LINDON, J. C. ; NICHOLSON, J. K. ; HOLMES, E. ; KEUN, H. C. ; CRAIG, A. ; PEARCE, J. T. ; BRUCE, S. J. ; HARDY, N. ; SANSONE, S. A. ; ANTTI, H. ; JONSSON, P. ; DAYKIN, C. ; NAVARANGE, M. ; BERGER, R. D. ; VERHEIJ, E. R. ; AMBERG, A. ; BAUNSGAARD, D. ; CANTOR, G. H. ; LEHMANN-KEEMAN, L. ; EARLL, M. ; WOLD, S. ; JOHANNSON, E. ; HASELDEN, J. N. ; KRAMER, K. ; THOMAS, C. ; LINDBERG, J. ; SCHUPPE-KOISTINEN, I. ; WILSON, I. D. ; REILLY, M. D. ; ROBERTSON, D. G. ; SENN, H. ; KROTZKY, A. ; KOCHHAR, S. ; POWELL, J. ; OUDERAA, F. van der ; PLUMB, R. ; SCHAEFER, H. ; SPRAUL, M.: Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nature Biotechnology* 23 (2005), S. 833 – 838
- López et al. 2002** LÓPEZ, R. ; AZNAR, M. ; CACHO, J. ; FERREIRA, V.: Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 966 (2002), S. 167 – 177
- Maga 1989** MAGA, J. A.: The contribution of wood to the flavor of alcoholic beverages. *Food Reviews International* 5 (1989), S. 39 – 99
- Mangas et al. 1997** MANGAS, J. J. ; RODRÍGUEZ, R. ; MORENO, J. ; SUÁREZ, B. ; BLANCO, D.: Furanic and Phenolic Composition of Cider Brandy. A Chemometric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997), S. 4076 – 4079
- Mannina et al. 2001** MANNINA, L. ; PATUMI, M. ; PROIETTI, N. ; BASSI, D. ; SEGRE, A. L.: Geographical characterization of italian extra virgin olive oils using

- high-field ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001), S. 2687 – 2696
- Martin et al. 1988** MARTIN, G. J. ; GUILLOU, C. ; MARTIN, M. L. ; CABANIS, M.-T. ; TEP, Y. ; AERNY, J.: Natural Factors of Isotope Fractionation and the Characterization of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36 (1988), S. 316 – 322
- Martínez et al. 2008** MARTÍNEZ, J. ; CADAHÍA, E. ; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. ; OJEDA, S. ; RUBIO, P.: Effect of the Seasoning Method on the Chemical Composition of Oak Heartwood to Cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008), S. 3089 – 3096
- Massart und Kaufman 1983** MASSART, D. L. ; KAUFMAN, L.: *The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis*. John Wiley & Sons, New York 1983
- Masson et al. 2000** MASSON, E. ; BAUMES, R. ; GUERNEVE, C. L. ; PUECH, J.-L.: Identification of a Precursor of β -Methyl- γ -octalactone in the Wood of Sessile Oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000), S. 4306 – 4309
- Matricardi und Waterhouse 1999** MATRICARDI, L. ; WATERHOUSE, A. L.: Influence of Toasting Technique on Color and Ellagitannins of Oak Wood in Barrel Making. *American Journal of Enology and Viticulture* 50 (1999), S. 519 – 526
- Mayer et al. 1967** MAYER, W. ; GABLER, W. ; RIESTER, A. ; KORGER, H.: Über die Gerbstoffe aus dem Holz der Edelkastanie und Eiche, II. Die Isolierung von Castalagin, Vescalagin, Castalin und Vescalin. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 707 (1967), S. 177 – 181
- Meyer 2009** MEYER, V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10. vollst. überarb. u. erw. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009
- Moret et al. 1994** MORET, I. ; SCARPONI, G. ; CESCO, P.: Chemometric Characterization and Classification of Five Venetian White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (1994), S. 1143 – 1153
- Mosedale und Puech 1998** MOSEDALE, J. R. ; PUECH, J.-L.: Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Technology* 9 (1998), S. 95 – 101

- Mosedale und Savill 1996** MOSEDALE, J. R. ; SAVILL, P.S.: Variation of heartwood phenolics and oak lactones between the species and phenological types of *Quercus petraea* and *Q. robur*. *Forestry* 69 (1996), S. 47 – 55
- Mosedale 1995** MOSEDALE, J. R.: Effects of oak wood on the maturation of alcoholic beverages with particular reference to whisky. *Forestry* 68 (1995), S. 203 – 230
- Müller et al. 2011** MÜLLER, M. ; CHRISTOPH, N. ; WACHTER, H. ; KÖHLER, H.-J. ; WINTERHALTER, P.: Analytical and Multivariate Statistical Methods for Differentiation of Wines Produced with Oak chips and Barriques. EBELER, S. AND TAKEOKA, G. R. AND WINTERHALTER, P. (Hrsg.): *In: Progress in authentication of food and wine*. 2011 (ACS Symposium Series Bd. 1081), S. 151 – 163
- Neidig 2005** NEIDIG, K.-P.: *Amix-Viewer & Amix Software Manual*, 2005
- Nonier Bourden et al. 2008** NONIER BOURDEN, M. F. ; VIVAS, N. ; ABSALON, C. ; VITRY, C. ; FOUQUET, E. ; VIVAS DE GAULEJAC, N.: Structural diversity of nucleophilic adducts from flavanols and oak wood aldehydes. *Food Chemistry* 107 (2008), S. 1494 – 1505
- Nonier et al. 2005** NONIER, M.-F. ; VIVAS, N. ; GAULEJAC, N. Vivas D. ; ABSALON, C. ; VITRY, C. ; FOUQUET, E.: Global fractionation of oak heartwood extractable polymers (lignins, polysaccharides and ellagitannins) by selective precipitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (2005), S. 343 – 353
- Ortega-Heras et al. 2004** ORTEGA-HERAS, M. ; GONZÁLEZ-HUERTA, C. ; HERRERA, P. ; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.: Changes in wine volatile compounds of varietal wines during ageing in wood barrels. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004), S. 341 – 350
- Ortega-Heras et al. 2007** ORTEGA-HERAS, M. ; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. ; GONZÁLEZ-HUERTA, C.: Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. *Food Chemistry* 103 (2007), S. 1434 – 1448
- Overhauser 1953** OVERHAUSER, A. W.: Polarization of Nuclei in Metals. *Physical Review* 92 (1953), S. 411 – 415
- Pearson 1901** PEARSON, K.: On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. *Philosophical Magazine* 2 (1901), S. 559 – 572

- Peña-Neira et al. 2000** PEÑA-NEIRA, A. ; HERNÁNDEZ, T. ; GARCÍA-VALLEJO, C. ; ESTRELLA, I. ; SUAREZ, J. A.: A survey of phenolic compounds in spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology* 210 (2000), S. 445 – 448
- Perez-Coello et al. 1997** PEREZ-COELLO, M. S. ; SANZ, J. ; CABEZUDO, M. D.: Analysis of volatile components of oak wood by solvent extraction and direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 778 (1997), S. 427 – 434
- Perez-Coello et al. 1999** PEREZ-COELLO, M. S. ; SANZ, J. ; CABEZUDO, M. D.: Determination of Volatile Compounds in Hydroalcoholic Extracts of French and American Oak Wood. *American Journal of Enology and Viticulture* 50 (1999), S. 162 – 165
- Perez-Coello et al. 2000** PEREZ-COELLO, M. S. ; SANCHEZ, M. A. ; GARCIA, E. ; GONZALEZ-VINAS, M. A. ; SANZ, J. ; CABEZUDO, M. D.: Fermentation of White Wines in the Presence of Wood Chips of American and French Oak. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000), S. 885 – 889
- Pérez-Magariño und González-San José 2005** PÉREZ-MAGARIÑO, S. ; GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, M. L.: Effect of ripening stage of grapes on the low molecular weight phenolic compounds of red wines. *European Food Research and Technology* 220 (2005), S. 597 – 606
- Pollnitz et al. 1999** POLLNITZ, A. P. ; JONES, G. P. ; SEFTON, M. A.: Determination of oak lactones in barrel-aged wines and in oak extracts by stable isotope dilution analysis. *Journal of Chromatography A* 857 (1999), S. 239 – 246
- Puech et al. 1999** PUECH, J.-L. ; FEUILLAT, F. ; MOSEDALE, J. R.: The Tannins of Oak Heartwood: Structure, Properties, and Their Influence on Wine Flavor. *American Journal of Enology and Viticulture* 50 (1999), S. 469 – 478
- Purcell et al. 1946** PURCELL, E. M. ; TORREY, H. C. ; POUND, R.V.: Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Reviews* 69 (1946), S. 37 – 38
- Ramiah 1970** RAMIAH, M. V.: Thermogravimetric and Differential Thermal Analysis of Cellulose, Hemicellulose and Lignin. *Journal of Applied Polymer Science* 14 (1970), S. 1323 – 1337

- Ribéreau-Gayon et al. 2006** RIBÉREAU-GAYON, P. ; GLORIES, Y. ; MAUJEAN, A. ; DUBOURDIEU, D.: *In: Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatment 2nd Edition*. John Wiley & Sons, Ltd, 2006
- Rodriguez-Bencomo et al. 2009** RODRIGUEZ-BENCOMO, J. J. ; ORTEGA-HERAS, M. ; PEREZ-MAGARIÑO, S. ; GONZALEZ-HUERTA, C.: Volatile Compounds of Red Wines Macerated with Spanish, American, and French Oak Chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009), S. 6383 – 6391
- Sacchi et al. 1997** SACCHI, R. ; ADDEO, F. ; PAOLILLO, L.: ¹H and ¹³C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magnetic Resonance in Chemistry* 35 (1997), S. S133 – S145
- Scalbert et al. 1988** SCALBERT, A. ; MONTIES, B. ; FAVRE, J.-M.: Polyphenols of *Quercus robur*: Adult tree and in vitro grown calli and shoots. *Phytochemistry* 27 (1988), S. 3483 – 3488
- Seeber et al. 1991** SEEBER, R. ; SFERLAZZO, G. ; LEARDI, R. ; DALLA SERRA, A. ; VERSINI, G.: Multivariate Data Analysis in Classification of Musts and Wines of the Same Variety According to Vintage Year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (1991), S. 1764 – 1769
- Singleton 1987** SINGLETON, V. L.: Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. *American Journal of Enology and Viticulture* 38 (1987), S. 69 – 77
- Socolsky et al. 2003** SOCOLSKY, C. ; SALVATORE, A. ; ASAKAWA, Y. ; BARDÓN, A.: Bioactive new bitter-tasting *p*-hydroxystyrene glycoside and other constituents from the fern *Ellaphoglossum spathulatum*. *ARKIVOC* Part x (2003), S. 347 – 355
- Spillman et al. 2004a** SPILLMAN, P. J. ; SEFTON, M. A. ; GAWEL, R.: The contribution of volatile compounds derived during oak barrel maturation to the aroma of a Chardonnay and Cabernet Sauvignon wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10 (2004), S. 227 – 235
- Spillman et al. 2004b** SPILLMAN, P. J. ; SEFTON, M. A. ; GAWEL, R.: The effect of oak wood source, location of seasoning and coopering on the composition of volatile compounds in oak-matured wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10 (2004), S. 216 – 226

- Stahle und Wold 1987** STAHLE, L. ; WOLD, S.: Partial Least Squares Analysis with Cross-Validation for the Two-Class Problem: A Monte Carlo Study. *Journal of Chemometrics* 1 (1987), S. 185 – 196
- Steidl und Leindl 2001** STEIDL, R. ; LEINDL, G.: *Barriqueausbau: Grundlagen Möglichkeiten Varianten*. Eugen Ulmer Verlag, österreichischer Agrarverlag, Leopoldsdorf, 2001
- Steinbeiss et al. 2006** STEINBEISS, S. ; SCHMIDT, C. M. ; HEIDE, K. ; GLEIXNER, G.: $\delta^{13}\text{C}$ values of pyrolysis products from cellulose and lignin represent the isotope content of their precursors. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 75 (2006), S. 19 – 26
- Stoyanova et al. 2004** STOYANOVA, R. ; NICHOLSON, J. K. ; LINDON, J. C. ; BROWN, T. R.: Simple Classification Based on Bayesian Spectral Decomposition of Metabonomic NMR Data Sets. *Analytical Chemistry* 76 (2004), S. 3666 – 2674
- Suomalainen und Nykänen 1970a** SUOMALAINEN, M. ; NYKÄNEN, L.: Composition of whisky flavour. *Process Biochemistry* 5 (1970), S. 13 – 18
- Suomalainen und Nykänen 1970b** SUOMALAINEN, M. ; NYKÄNEN, L.: Investigations on the aroma of alcoholic beverages. *Naeringsmiddelindustrien* 23 (1970), S. 15 – 30
- Tanaka und Kuono 1996** TANAKA, T. ; KUONO, I.: Whisky Lactone Precursors from the Wood of *Platycarya strobilacea*. *Journal of Natural Products* 59 (1996), S. 997 – 999
- Trygg et al. 2007** TRYGG, J. ; HOLMES, E. ; LUNDSTEDT, T.: Chemometrics in Metabonomics. *Journal of Proteome Research* 6 (2007), S. 469 – 479
- Trygg und Wold 2002** TRYGG, J. ; WOLD, S.: Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics* 16 (2002), S. 119 – 128
- van den Berg et al. 2006** BERG, R. A. van den ; HOEFSLOOT, H. C. J. ; WESTERHUIS, J. A. ; SMILDE, A. K. ; WERF, M. J. van der: Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7 (2006), S. 142
- VERORDNUNG (EG) Nr. 1507/2006** VERORDNUNG (EG) NR. 1507/2006: vom 11. Oktober 2006 zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1622/2000,

(EG) Nr. 884/2001 und (EG) Nr. 753/2002 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1493/1999 des Rates über die gemeinsame Marktorganisation für Wein hinsichtlich der Bedingungen für die Verwendung von Eichenholzstücken bei der Weinbereitung und für die Bezeichnung und Aufmachung der betreffenden Weine.

VERORDNUNG (EG) Nr. 606/2009 VERORDNUNG (EG) NR. 606/2009: vom 10. Juli 2009 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 479/2008 des Rates hinsichtlich der Weinbauerzeugniskategorien, der önologischen Verfahren und der diesbezüglichen Einschränkungen; ABl. EG NR. 193/1.

VERORDNUNG (EG) Nr. 607/2009 VERORDNUNG (EG) NR. 607/2009: vom 14. Juli 2009 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 479/2008 des Rates hinsichtlich der geschützten Ursprungsbezeichnungen und geografischen Angaben, der traditionellen Begriffe sowie der Kennzeichnung und Aufmachung bestimmter Weinbauerzeugnisse; ABl. EG NR. 193/60.

Vichi et al. 2007 VICHI, S. ; SANTINI, C. ; NATALI, N. ; RIPONI, C. ; LÓPEZ-TAMAMES, E. ; BUXADERAS, S.: Volatile and semi-volatile components of oak wood chips analysed by Accelerated Solvent Extraction (ASE) coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Food Chemistry* 102 (2007), S. 1260 – 1269

Vidal et al. 2004 VIDAL, S. ; FRANCIS, L. ; NOBLE, A. ; KWIATKOWSKI, M. ; CHEYNIER, V. ; WATERS, E.: Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004), S. 57 – 65

Viriot et al. 1993 VIRIOT, C. ; SCALBERT, A. ; LAPIERRE, C. ; MOUTOUNET, M.: Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (1993), S. 1872 – 1879

Vivas et al. 1995 VIVAS, N. ; LAGUERRE, M. ; GLORIES, Y. ; BOURGEOIS, G. ; VITRY, C.: Structure simulation of two ellagitannins from *Quercus robur* L. *Phytochemistry* 39 (1995), S. 1193 – 1199

Vivas et al. 2004 VIVAS, N. ; NONIER, M.-F. ; GAULEJAC, N. V. de ; BOISSEL, I. P. de: Occurrence and partial characterization of polymeric ellagitannins in *Quercus petraea* Liebl. and *Q. robur* L. wood. *Comptes Rendus Chimie* 7 (2004), S. 945 – 954

- Vogel 2010** VOGEL, P.: *Analytischer Nachweis und Quantifizierung von polyphenolen Inhaltsstoffen im Wein, die im Zusammenhang mit Holzkontakt stehen*, Hochschule RheinMain, Fachbereich Geisenheim, Masterarbeit, 2010
- Waterhouse und Laurie 2006** WATERHOUSE, A. L. ; LAURIE, V. F.: Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture* 57 (2006), S. 306 – 313
- Waterhouse und Towey 1994** WATERHOUSE, A. L. ; TOWEY, J. P.: Oak Lactone Isomer Ratio Distinguishes between Wine Fermented in American and French Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (1994), S. 1971 – 1974
- Waterhouse 2002** WATERHOUSE, A. L.: Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957 (2002), S. 21 – 36
- Weinverordnung 2009** WEINVERORDNUNG: in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. April 2009 (BGBl. I S. 827), zuletzt geändert durch Art. 1 der VO zur Änd. WeinVO und der Alkoholhaltige Getränke-VO vom 15.6.2010 (BGBl. I S. 800). *BGBl. I S. 827* (2009)
- Westerhuis et al. 1998** WESTERHUIS, J. A. ; KOURTI, T. ; MACGREGOR, J. F.: Analysis of multiblock and hierarchical PCA and PLS models. *Journal of Chemometrics* 12 (1998), S. 301 – 321
- Wilkinson et al. 2004** WILKINSON, K. L. ; ELSEY, G. M. ; PRAGER, R. H. ; TANAKA, T. ; SEFTON, M. A.: Precursors to oak lactone. Part 2: Synthesis, separation and cleavage of several β -D-glucopyranosides of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid. *Tetrahedron* 60 (2004), S. 6091 – 6100
- Wilkner und Gallander 1989** WILKNER, K. L. ; GALLANDER, J. F.: Comparison of Seyval blanc Wines Aged with Air- and Kiln-Dried American Oak. *American Journal of Enology and Viticulture* 40 (1989), S. 224 – 226
- Wold et al. 1983** WOLD, S. ; ALBANO, C. ; DUNN, W. J. ; ESBENSEN, K. ; HELLBERG, S. ; JOHANSSON, E. ; SJÖSTRÖM, M.: Pattern recognition: finding and using regularities in multivariate data. MARTENS, H. AND RUSSWURM, H. (Hrsg.): *In: Food Research and Data Analysis*. London, 1983, S. 147 – 188
- Wold et al. 1987** WOLD, S. ; ESBENSEN, K. ; GELADI, P.: Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2 (1987), S. 37 – 52

- Wold und Sjöström 1998** WOLD, s. ; SJÖSTRÖM, M.: Chemometrics, present and future success. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 44 (1998), S. 3 – 14

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojekts „Analytische und multivariate statistische Verfahren zum Nachweis einer Aromatisierung von Wein mit Eichenholzstücken und Holzextrakten“ am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Dienststelle Würzburg, im Zeitraum von Juli 2007 bis Dezember 2010 durchgeführt. Das Forschungsprojekt wurde vom Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW) in der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG) sowie vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit (FKZ UGV04090803098) finanziell gefördert. Die Arbeit wurde von meinem Mentor Herr Prof. Dr. Peter Winterhalter vom Institut für Lebensmittelchemie an der TU Braunschweig sowie vom Leiter des Forschungsprojekts Herrn Dr. Norbert Christoph, Sachbereich Wein, Aromaanalytik und Kernresonanzspektroskopie, LGL, wissenschaftlich betreut.

Besonderer Dank gilt:

- ◆ dem Forschungsring des Deutschen Weinbaus und dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit für die finanzielle Förderung des Projekts.
- ◆ dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für den Arbeitsplatz und die Möglichkeit meine Arbeit im Rahmen des Projekts an der Dienststelle Würzburg durchzuführen.
- ◆ Herrn Prof. Dr. Winterhalter für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit die Inhalte der Arbeit nach meinen Vorstellungen zu gestalten, für die Unterstützung während der Arbeit und die Möglichkeit das Thema beim ACS Kongress in San Francisco zu präsentieren.
- ◆ Herrn Dr. Christoph für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit zur Nutzung der Analysensysteme im LGL, die Anregungen und konstruktiven Diskussionen und die Möglichkeit das Thema auf das Gebiet der Kernresonanzspektroskopie auszudehnen.
- ◆ Herrn Dr. Helmut Wachter für die Einführung in die Geheimnisse der multivariaten Statistik und die Unterstützung bei der Auswertung der Daten.
- ◆ Herrn Landwirtschaftsoberrat Hans-Jürgen Köhler, Sachgebiet Önologie an der Bayerischen Landesanstalt für Wein- und Gartenbau in Veitshöchheim,

für die Bereitstellung authentischer mit Barrique und Chips behandelter Weine sowie für die Diskussionen zu kellertechnischen Fragen.

- ◆ Den Kollegen Simone Krug, Gerald Rakow und Dipl. Ing. (FH) Roland Harth im GC-MS Labor der Dienststelle Würzburg für die Unterstützung bei der Aufarbeitung, der Analytik und für die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen.
- ◆ Den Kolleginnen Regina Masurek und Rita Hein-Salomon im NMR Labor für die Unterstützung bei der Aufarbeitung und bei der Bedienung des Gerätes.
- ◆ Den Praktikantinnen und Praktikanten Sandra Heil, Bastian Christ, Katja Goede und Julia Samfaß sowie dem Masteranden Peter Vogel, die ich während meiner Arbeit betreut habe und die mich mit Ergebnissen spezieller Projekte unterstützt haben.
- ◆ Frau Carola Balcke vom Institut für Lebensmittelchemie an der TU Braunschweig für die effizienten und zügigen Korrekturen.
- ◆ den Kollegen aus dem Fruchtsaftlabor für die vielen anregenden Diskussionen und Gespräche!

Ganz spezieller Dank geht an meine Eltern, die mich während meines Studiums unterstützt und ermutigt haben, meinen Weg zu gehen. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, mein Studium mit einem Semester in Schweden zu erweitern.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann Markus bedanken, für die Unterstützung und die Hilfe während meiner Arbeit.

Anhang

Holz- Nr.	Jahrgang	Art	Rebsorte	önolog. Behandl.	Herkunft
1	2006	B-authentisch	Regent	Barrique	Deutschland, Franken
2	2006	B-authentisch	Rondo	Barrique	Deutschland, Franken
3	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
4	2005	B-authentisch	Zweigelt	Barrique	Deutschland, Franken
5	2005	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
6	2006	B-authentisch	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
7	2006	B-authentisch	Regent	Barrique	Deutschland, Franken
8	2006	B-authentisch	Regent	Barrique	Deutschland, Franken
9	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
10	2006	B-authentisch	Cabernet Dorsa	Barrique	Deutschland, Franken
11	2005	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
12	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
13	2004	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
14	2006	B-authentisch	Frühburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
15	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
16	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
17	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
18	2006	B-authentisch	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
19	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
20	2006	B-authentisch	Regent	Barrique	Deutschland, Franken
21	2006	B-authentisch	Cuvée Rot	Barrique	Deutschland, Franken
22	2007	B-authentisch	Regent	Barrique	Deutschland, Franken
23	2006	B-authentisch	Dornfelder	Barrique	Deutschland, Franken
24	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
25	2006	B-authentisch	Portugieser	Barrique	Deutschland, Franken

26	2006	B-authentisch	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
27	2007	B-authentisch	Cabernet Dorsa	Barrique	Deutschland, Franken
28	2006	B-authentisch	Cuvée Weiß	Barrique	Deutschland, Franken
29	2006	B-authentisch	Weißer Burgunder	Barrique	Deutschland, Franken
30	2006	B-authentisch	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
31	2007	B-authentisch	Schwarzriesling	Barrique	Deutschland, Franken
32	2006	B-authentisch	Bacchus	Barrique	Deutschland, Franken
33	2007	B-authentisch	Rotling	Barrique	Deutschland, Franken
34	2006	B-authentisch	Weißer Burgunder	Barrique	Deutschland, Franken
35	2006	B-authentisch	Rotwein Cuvée	Barrique	Deutschland, Franken
36	2006	B-authentisch	Dornfelder	Barrique	Deutschland, Franken
37	2006	B-authentisch	Silvaner	Barrique	Deutschland, Franken
38	2006	B-authentisch	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
39	2006	B-authentisch	Dornfelder	Barrique	Deutschland, Franken
40	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
41	2006	B-authentisch	Dornfelder	Barrique	Deutschland, Franken
42	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
43	2006	B-authentisch	Merlot	Barrique	Deutschland, Franken
44	2006	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
45	2006	B-authentisch	Regent	Barrique	Deutschland, Franken
46	2006	B-authentisch	Doming	Barrique	Deutschland, Franken
47	2006	B-authentisch	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
48	2006	authentisch	Silvaner	Ballon, ohne Chips	Deutschland, Franken
49	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
50	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
52	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
54	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 1 FLH	Deutschland, Franken
55	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 2 FLM	Deutschland, Franken

56	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
57	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
58	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 6 ASH	Deutschland, Franken
59	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 7 ALM	Deutschland, Franken
60	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
61	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
62	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
63	2006	authentisch	Silvaner	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
64	2006	authentisch	Silvaner	Barrique MT	Deutschland, Franken
67	2006	authentisch	Silvaner	Barrique	Deutschland, Franken
69	2006	authentisch	Silvaner	Best Oak 8 MT	Deutschland, Franken
70	2006	authentisch	Silvaner	Best Oak 8 HT	Deutschland, Franken
79	2006	authentisch	Domina	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
80	2006	authentisch	Domina	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
81	2006	authentisch	Domina	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
82	2006	authentisch	Domina	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
83	2006	authentisch	Domina	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
84	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 1 FLH	Deutschland, Franken
85	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 2 FLM	Deutschland, Franken
86	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
87	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
88	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 6 ASH	Deutschland, Franken
89	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 7 ALM	Deutschland, Franken
90	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
91	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
92	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
93	2006	authentisch	Domina	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
97	2006	authentisch	Domina	Best Oak 8 MT	Deutschland, Franken

98	2006	authentisch	Domina	Best Oak 8 HT	Deutschland, Franken
107	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
108	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
109	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
110	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
111	2007	authentisch	Silvaner	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
112	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
113	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
114	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
115	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
116	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
117	2007	authentisch	Silvaner	Französische Eiche, MT, Barrique	Deutschland, Franken
118	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 LT	Deutschland, Franken
119	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 MT	Deutschland, Franken
120	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 HT	Deutschland, Franken
121	2007	authentisch	Silvaner	franz. Eiche, Barrique	Deutschland, Franken
124	2007	authentisch	Silvaner	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
126	2007	authentisch	Silvaner	mit Chips Oakyvin 6	Deutschland, Franken
128	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
129	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
130	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
131	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
132	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
133	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
134	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
135	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
136	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
137	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken

138	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Französische Eiche, MT, Barrique	Deutschland, Franken
139	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 LT	Deutschland, Franken
140	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 MT	Deutschland, Franken
141	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 HT	Deutschland, Franken
145	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
147	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	mit Chips Oakyvin 6	Deutschland, Franken
150	2008		Weißburgunder	Tank 139, Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Ba-Wü
151	2008		Weißburgunder	Tank 97, Chips in Gärung	Deutschland, Ba-Wü
152	2008		Weißburgunder	Fass 37, Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Ba-Wü
153	2008		Weißburgunder	Barrique 31, 1. Belegung	Deutschland, Ba-Wü
154	2008		Weißburgunder	Barrique 2. Bel., Chips nach Gär., 2,5 g/l	Deutschland, Ba-Wü
155	2008		Riesling	Tank 142, Kontrolle	Deutschland, Ba-Wü
156	2008		Riesling	Tank 140, Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Ba-Wü
157	2008		Riesling	T 137, Chips in Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Ba-Wü
158	2008		Riesling	Fass 38, Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Ba-Wü
159	2008		Riesling	Barrique 34, 1. Belegung	Deutschland, Ba-Wü
160	2008		Riesling	Barrique 13., 2. Bel., Chips nach Gär., 2,5 g/l	Deutschland, Ba-Wü
168	2008	unbekannt	Bacchus	kleines Barrique, 2. Beleg., Fass Assmann	Deutschland, Franken
169	2008	unbekannt	Bacchus	kleines Barrique, 2. Beleg., Fass Müller	Deutschland, Franken
170	2008		Dornfelder Merlot	Barrique	Deutschland, Rheinhausen
173	2008	unbekannt	Spätburgunder	Xylo one, franz. Barrique, Allier	Deutschland, Franken
174	2008	unbekannt	Spätburgunder	Xylo one, amerik. Barrique	Deutschland, Franken
175	2008	unbekannt	Regent	Xylo one, amerik. Barrique, US	Deutschland, Franken
176	2008	unbekannt	Domina	Xylo one, amerik. Barrique, US	Deutschland, Franken
177	2008	unbekannt	Domina	trust hungarian oak, 500 l, Deckel getoastet	Deutschland, Franken
178	2008	unbekannt	Domina	trust hungarian oak, 500 l, Deckel getoastet	Deutschland, Franken
181	2008	unbekannt	blauer Zweigelt	Barrique, frz. Eiche, Allier, 3 mal belegt	Deutschland, Franken
182	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique, Spessarteiche, Assmann	Deutschland, Franken

184	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
187	2008	unbekannt	Blaufränkisch	gebrauchtes Barrique	Deutschland, Franken
188	2008	unbekannt	Domina	großes Holzfass	Deutschland, Franken
189	2008	unbekannt	Spätburgunder/Domina	Barrique	Deutschland, Franken
190	2006	unbekannt	Portugieser	Barrique	Deutschland, Franken
191	2007	unbekannt	Portugieser	Barrique	Deutschland, Franken
192	2002	unbekannt	Sangiovese	Barrique	Italien
194	2003	unbekannt	Cabernet Sauvignon	Oakbarrels	
195	2008	unbekannt	Weißburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
198	2009		Dornfelder	Holzfass	Deutschland, Franken
255	2006	unbekannt	Cabernet Sauvignon + Merlot	Barrique	Deutschland, Franken
256	2008	unbekannt	Cabernet Sauvignon	Barrique	Frankreich
258	2006	unbekannt	Tempranillo	Eichenfass	Chile
260	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Spanien
261	2007	unbekannt	Spätburgunder & Domina	Barrique, 15 Monate, Alliers, MT	Deutschland, Franken
262	2007	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
263	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique, 12 Monate	Deutschland, Franken
264	2009	unbekannt	Cabernet Mitos	Barrique	Deutschland, Franken
267	2007	unbekannt	Spätburgunder	Barrique, 1/2 neues Fass, 1/2 altes Fass	Deutschland, Franken
268	2008	unbekannt	Domina	Chips, Nobile Sweet	Deutschland, Franken
269	2007	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
270	2009	unbekannt	Weißer Burgunder	Barrique	Deutschland, Franken
272	2009	unbekannt	Spätburgunder	offene Maischegärung, sens. Holznote	Deutschland, Franken
273	2006	unbekannt	Acolon	Barrique	Deutschland, Franken
274	2006	unbekannt	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
275	2008	unbekannt	Spätburgunder	sensorische Holznote	Deutschland, Franken
276	2009	unbekannt	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
278	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken

279	2008	unbekannt	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
280	2008	unbekannt	Domina	Barrique, 15 Mon., 50% Neuholz, Barttonage	Deutschland, Franken
282	2007	unbekannt	Regent-Dornfelder	Chips	Deutschland, Franken
284	2008	unbekannt	Cabernet Sauvignon		Afrika
286	2007	unbekannt			Frankreich
287	2009	unbekannt	Sangiovese, Merlot, Cabern. Sauv.	Holzkontakt	Italien, Rubicone
288	2008	unbekannt	Merlot	Barrique	Deutschland, Franken
290	2009	unbekannt	Grauer Burgunder	Barrique	Deutschland, Franken
291	2009	unbekannt	Cabernet Dorsa	Barrique	Deutschland, Franken
292	2008	unbekannt	Weißer Burgunder	Barrique	Deutschland, Franken
293	2009	unbekannt	Grauer Burgunder		Deutschland, Franken
295	2008	unbekannt	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
298		unbekannt		Barrique	Deutschland, Baden
300	2003	authentisch	Chardonnay	2,5g/L Chips in Most, Verg. im Glasballon	Deutschland, Rheinland-Pfalz
301	2003	B-authentisch	Chardonnay	Barrique-Allier; gebr. Fass, 20min.gedämpft	Deutschland, Rheinland-Pfalz
302	2003	B-authentisch	Chardonnay	Barrique-Allier; gebr. Faß, 40min. Gedämpft	Deutschland, Rheinland-Pfalz
303	2003	B-authentisch	Chardonnay	Gebr. Barrique, ausgehob., neu get.	Deutschland, Rheinland-Pfalz
304	2003	B-authentisch	Chardonnay	Neues Barrique, 1. Bel., Allier	Deutschland, Rheinland-Pfalz
305	2009	B-authentisch	Weißer Burgunder	Kontrolle	Deutschland, Rheinland-Pfalz
306	2009	authentisch	Weißer Burgunder	Chips, 3g/L vor AG	Deutschland, Rheinland-Pfalz
307	2009	authentisch	Weißer Burgunder	Chips, 3g/L nach BSA	Deutschland, Rheinland-Pfalz
308		authentisch	Cabernet Dorsa	Maischegär: nach Saftabzug + Chips	Deutschland, Franken
309		authentisch	Cabernet Dorsa	Maischegär: nach Saftabzug + Chips	Deutschland, Franken
311		authentisch	Cabernet Dorsa	Maischeerhitzen + Chips	Deutschland, Franken
313		authentisch	Domina	Maischegär, 20% Saftabzug, 5g/L Chips, unget.	Deutschland, Franken
314		authentisch	Regent	2g/L Chips medium nach Gärung	Deutschland, Franken
324	2009	B-authentisch	Müller Thurgau	Barrique	Deutschland, Franken
325	2009	B-authentisch	Silvaner	Barrique	Deutschland, Franken

327	authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland
328	authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland
332	authentisch	Lemberger	franz. Oak-Chips 3 g/L, Most	Deutschland
333	authentisch	Lemberger	franz. Oak-Chips 3 g/L, nach BSA	Deutschland
334	authentisch	Lemberger	franz. Oak-Chips 3 g/L, Most, gebr. Barrique	Deutschland
336	authentisch	Schwarzriesling	4 g/L amerikanischen Chips nach BSA	Deutschland
337	authentisch	Schwarzriesling	40 g/L amerikanischen Chips nach BSA	Deutschland
340	authentisch	Silvaner	Mitvergär. von amerik. Chips 1,5 g/L	Deutschland
341	authentisch	Silvaner	amerik. Chips, 1,5 g/L nach BSA	Deutschland
342	2005	Dornfelder	Barrique	Deutschland, Pfalz
344	2009	Acolon	Barrique	Deutschland, Franken

Tabelle A.1: Übersicht über die Weine, die mittels GC-MS gemessen wurden und zur Modellbildung eingesetzt wurden.

Holz-Nr.	Jahrgang	Art	Rebsorte	önolog. Behandl.	Herkunft
49	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
50	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
52	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
55	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 2 FLM	Deutschland, Franken
56	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
57	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
58	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 6 ASH	Deutschland, Franken
59	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 7 ALM	Deutschland, Franken
61	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
62	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
68	2006	authentisch	Silvaner	großes Holzfass	Deutschland, Franken
70	2006	authentisch	Silvaner	Best Oak 8 HT	Deutschland, Franken
79	2006	authentisch	Domina	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
80	2006	authentisch	Domina	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
81	2006	authentisch	Domina	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
82	2006	authentisch	Domina	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
83	2006	authentisch	Domina	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
84	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 1 FLH	Deutschland, Franken
85	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 2 FLM	Deutschland, Franken
86	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
87	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
88	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 6 ASH	Deutschland, Franken
89	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 7 ALM	Deutschland, Franken
90	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
91	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken

92	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
94	2006	authentisch	Domina	Barrique MT	Deutschland, Franken
95	2006	authentisch	Domina	Barrique MT	Deutschland, Franken
97	2006	authentisch	Domina	Best Oak 8 MT	Deutschland, Franken
107	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
108	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
109	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
110	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
111	2007	authentisch	Silvaner	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
112	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
113	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
114	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
115	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
116	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
117	2007	authentisch	Silvaner	Französische Eiche, MT, Barrique	Deutschland, Franken
118	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 LT	Deutschland, Franken
119	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 MT	Deutschland, Franken
120	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 HT	Deutschland, Franken
121	2007	authentisch	Silvaner	franz. Eiche, Barrique	Deutschland, Franken
123	2007	authentisch	Silvaner	Spessart, Barrique	Deutschland, Franken
124	2007	authentisch	Silvaner	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
126	2007	authentisch	Silvaner	mit Chips Oakyvin 6	Deutschland, Franken
128	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
129	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
130	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
131	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
132	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
133	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken

134	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
135	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
136	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
137	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
138	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Französische Eiche, MT, Barrique	Deutschland, Franken
139	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 LT	Deutschland, Franken
140	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 MT	Deutschland, Franken
141	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 HT	Deutschland, Franken
142	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	franz. Eiche, Barrique	Deutschland, Franken
144	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Spessart, Barrique	Deutschland, Franken
145	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
147	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	mit Chips Oakyvin 6	Deutschland, Franken
150	2008	authentisch	Weißburgunder	Tank 139, Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
151	2008	authentisch	Weißburgunder	Tank 97, Chips in Gärung	Deutschland, Baden-Württemberg
152	2008	authentisch	Weißburgunder	Fass 37, Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
153	2008	authentisch	Weißburgunder	Barrique 31, 1. Belegung	Deutschland, Baden-Württemberg
154	2008	authentisch	Weißburgunder	Barrique 2. Bel., Chips nach Gär., 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
156	2008	authentisch	Riesling	Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
157	2008	authentisch	Riesling	Chips in Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
158	2008	authentisch	Riesling	Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg

159	2008	authentisch	Riesling	Barrique, 1. Bel.	Deutschland, Baden-Württemberg
160	2008	authentisch	Riesling	Barrique, 2. Bel., Chips nach Gär., 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
162	2008	authentisch	Kelter Domina	Tank mit Chips bei Gärung	Deutschland, Franken
163	2008	authentisch	Kelter Domina	Tank mit Chips nach Gärung	Deutschland, Franken
164	2008	authentisch	Kelter Domina	Tank mit Chips bei/nach Gärung	Deutschland, Franken
165	2008	authentisch	Kelter Domina	Barrique Gärung und Ausbau	Deutschland, Franken
166	2008	authentisch	Kelter Domina	gebr. Barrique mit Chips bei Gärung	Deutschland, Franken
167	2008	authentisch	Kelter Domina	gebr. Barrique mit Chips bei/nach Gärung	Deutschland, Franken
168	2008	authentisch	Bacchus	kleines Barrique, 20 L, 2. Belegung	Deutschland, Franken
169	2008	authentisch	Bacchus	kleines Barrique, 20 L, 2. Belegung	Deutschland, Franken
170	2008	unbekannt	Dornfelder Merlot	Barrique	Deutschland, Rheinhessen
171	2006	unbekannt	Regent-Dornfelder	Holzfass + Chips	Deutschland, Franken
172	2006	unbekannt	Acolon Spätburgunder	Holzfass + Chips	Deutschland, Franken
173	2008	unbekannt	Spätburgunder	Xylo one, franz. Barrique, Allier	Deutschland, Franken
174	2008	unbekannt	Spätburgunder	Xylo one, amerik. Barrique	Deutschland, Franken
175	2008	unbekannt	Regent	Xylo one, amerik. Barrique	Deutschland, Franken
176	2008	unbekannt	Domina	Xylo one, amerik. Barrique	Deutschland, Franken
177	2008	unbekannt	Domina	trust hungarian oak, 500 L, Deckel get.	Deutschland, Franken
178	2008	unbekannt	Domina	trust hungarian oak, 500 L, Deckel get.	Deutschland, Franken
180	2008		Schwarzriesling	Stahltank + Chips sweet nobile	Deutschland, Franken
181	2008	unbekannt	blauer Zweigelt	Barrique, frz. Eiche, Allier, 3. Bel.	Deutschland, Franken
182	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique, 11 Monate, Spessarteiche	Deutschland, Franken
183	2008	unbekannt	Kabernet Cubin	Holzfass, Halbstück, Spessarteiche	Deutschland, Franken
184	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
185	2008	unbekannt	Spätburgunder	Holzfass	Deutschland, Franken
186	2008	unbekannt	Blaufränkisch	Holzfass	Deutschland, Franken

187	2008	unbekannt	Blaifränkisch	gebr. Barrique	Deutschland, Franken
188	2008	unbekannt	Domina	großes Holzfass	Deutschland, Franken
189	2008	unbekannt	Spätburgunder/Domina	Barrique	Deutschland, Franken
190	2006	unbekannt	Portugieser	Barrique	Deutschland, Franken
191	2007	unbekannt	Portugieser	Barrique	Deutschland, Franken
192	2002	unbekannt	Sangiovese	Barrique	Italien
193	2008		Silvaner	150 g/hl Chips, Oakyvin DM	
194	2003		Cabernet Sauvignon	oakbarrels	
195	2008		Weißburgunder	Barrique	Deutschland, Franken

Tabelle A.2: Übersicht über die Weine, die mittels HPLC gemessen wurden, deren Farbe bestimmt wurde und die zur Modellbildung eingesetzt wurden.

Holz- Nr.	Jahrgang	Art	Rebsorte	önolog. Behandl.	Herkunft
49	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
50	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
52	2006	authentisch	Silvaner	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
54	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 1 FLH	Deutschland, Franken
55	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 2 FLM	Deutschland, Franken
56	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
57	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
58	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 6 ASH	Deutschland, Franken
59	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 7 ALM	Deutschland, Franken
61	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
62	2006	authentisch	Silvaner	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
63	2006	authentisch	Silvaner	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
64	2006	authentisch	Silvaner	Barrique MT	Deutschland, Franken
65	2006	authentisch	Silvaner	Barrique MT	Deutschland, Franken
67	2006	authentisch	Silvaner	Barrique	Deutschland, Franken
69	2006	authentisch	Silvaner	Best Oak 8 MT	Deutschland, Franken
70	2006	authentisch	Silvaner	Best Oak 8 HT	Deutschland, Franken
79	2006	authentisch	Domina	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
80	2006	authentisch	Domina	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
81	2006	authentisch	Domina	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
82	2006	authentisch	Domina	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
83	2006	authentisch	Domina	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
84	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 1 FLH	Deutschland, Franken
85	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 2 FLM	Deutschland, Franken
86	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken

87	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
88	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 6 ASH	Deutschland, Franken
89	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 7 ALM	Deutschland, Franken
90	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
91	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
92	2006	authentisch	Domina	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
93	2006	authentisch	Domina	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
95	2006	authentisch	Domina	Barrique MT	Deutschland, Franken
98	2006	authentisch	Domina	Best Oak 8 HT	Deutschland, Franken
107	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken
108	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
109	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
110	2007	authentisch	Silvaner	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
111	2007	authentisch	Silvaner	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
112	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
113	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
114	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
115	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
116	2007	authentisch	Silvaner	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
117	2007	authentisch	Silvaner	Französische Eiche, MT, Barrique	Deutschland, Franken
118	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 LT	Deutschland, Franken
119	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 MT	Deutschland, Franken
120	2007	authentisch	Silvaner	Best Oak 4 HT	Deutschland, Franken
121	2007	authentisch	Silvaner	franz. Eiche, Barrique	Deutschland, Franken
123	2007	authentisch	Silvaner	Spessart, Barrique	Deutschland, Franken
124	2007	authentisch	Silvaner	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
126	2007	authentisch	Silvaner	mit Chips Oakyvin 6	Deutschland, Franken
128	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Fresh, Frankreich	Deutschland, Franken

129	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Sweet, Frankreich	Deutschland, Franken
130	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Spice, Frankreich	Deutschland, Franken
131	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile Intense, Frankreich	Deutschland, Franken
132	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Nobile American Blend	Deutschland, Franken
133	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 4 FSH	Deutschland, Franken
134	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 5 FSM	Deutschland, Franken
135	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 8 ALL	Deutschland, Franken
136	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 9 ASH	Deutschland, Franken
137	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Oakyvin 10 ASM	Deutschland, Franken
138	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Französische Eiche, MT, Barrique	Deutschland, Franken
139	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 LT	Deutschland, Franken
140	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 MT	Deutschland, Franken
141	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Best Oak 4 HT	Deutschland, Franken
142	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	franz. Eiche, Barrique	Deutschland, Franken
144	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Spessart, Barrique	Deutschland, Franken
145	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	Faßspäne Spessart	Deutschland, Franken
147	2007	authentisch	Rotwein, Cuvée	mit Chips Oakyvin 6	Deutschland, Franken
150	2008	authentisch	Weißburgunder	Tank 139, Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
151	2008	authentisch	Weißburgunder	Tank 97, Chips in Gärung	Deutschland, Baden-Württemberg
152	2008	authentisch	Weißburgunder	Fass 37, Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
153	2008	authentisch	Weißburgunder	Barrique 31, 1. Belegung	Deutschland, Baden-Württemberg
154	2008	authentisch	Weißburgunder	Barrique 2. Bel., Chips nach Gär., 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
156	2008	authentisch	Riesling	Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
157	2008	authentisch	Riesling	Chips in Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
158	2008	authentisch	Riesling	Chips nach Gärung, 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
159	2008	authentisch	Riesling	Barrique, 1. Bel.	Deutschland, Baden-Württemberg
160	2008	authentisch	Riesling	Barrique, 2. Bel., Chips nach Gär., 2,5 g/l	Deutschland, Baden-Württemberg
162	2008	authentisch	Kelter Domina	Tank mit Chips bei Gärung	Deutschland, Franken

163	2008	authentisch	Kelter Domina	Tank mit Chips nach Gärung	Deutschland, Franken
164	2008	authentisch	Kelter Domina	Tank mit Chips bei/nach Gärung	Deutschland, Franken
165	2008	authentisch	Kelter Domina	Barrique Gärung und Ausbau	Deutschland, Franken
166	2008	authentisch	Kelter Domina	gebr. Barrique mit Chips bei Gärung	Deutschland, Franken
167	2008	authentisch	Kelter Domina	gebr. Barrique mit Chips bei/nach Gärung	Deutschland, Franken
168	2008	authentisch	Bacchus	kleines Barrique, 20 L, 2. Belegung	Deutschland, Franken
171	2006	unbekannt	Regent-Dornfelder	Holzfass + Chips	Deutschland, Franken
172	2006	unbekannt	Acolon Spätburgunder	Holzfass + Chips	Deutschland, Franken
174	2008	unbekannt	Spätburgunder	Xylo one, amerik. Barrique	Deutschland, Franken
176	2008	unbekannt	Domina	Xylo one, amerik. Barrique	Deutschland, Franken
179	2008	unbekannt	Spätburgunder	Stahltank + Chips sweet nobile	Deutschland, Franken
180	2008	unbekannt	Schwarzriesling	Stahltank + Chips sweet nobile	Deutschland, Franken
182	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique, 11 Monate, Spessarteiche	Deutschland, Franken
187	2008	unbekannt	Blaufränkisch	gebr. Barrique	Deutschland, Franken
192	2002	unbekannt	Sangiovese	Barrique	Italien
200	2008	unbekannt	Domina + Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
212	2008	unbekannt	Chardonnay	Barrique	Deutschland, Franken
216	2008	unbekannt	Weißer Burgunder	Barrique	Deutschland, Franken
222	2009	authentisch	Neuzüchtung	5 g/L Chips medium zur Maischegärung	Deutschland
223	2009	authentisch	Neuzüchtung	5 g/L Chips medium getoastet zu Maischegärung	Deutschland
224	2009	authentisch	Neuzüchtung	5 g/L Chips medium getoastet zur Maischegärung	Deutschland
225	2009	authentisch	Neuzüchtung	5 g/L Chips medium zur Maischegärung	Deutschland
226	2009	authentisch	Dornfelder	Chips, High Vanilla, Cooperage	Deutschland
227	2009	authentisch	Dornfelder	Chips, High Vanilla, Cooperage	Deutschland
228	2009	authentisch	Dornfelder	Chips, High Vanilla, Cooperage	Deutschland
229	2009	authentisch	Dornfelder	Chips, High Vanilla , Cooperage	Deutschland
230	2009	authentisch	Dornfelder	Chips, High Vanilla, Cooperage	Deutschland
232	2008	unbekannt	Domina	Barrique	Deutschland, Franken

233	2008	unbekannt	Domina	Chips	Deutschland, Franken
234	2007	unbekannt	Cabernet Sauvignon	Barrique	Argentinien
235		unbekannt	Merlot	Chips Eiche	
236		unbekannt	Merlot	Chips Buche	
243	2009	unbekannt	Silvaner	Barrique, 7 Monate	Deutschland, Franken
245	2008	unbekannt	Weißer Burgunder	Barrique	Deutschland, Franken
255	2006	unbekannt	Cabernet Sauvignon + Merlot	Barrique	Frankreich
258	2006	unbekannt	Tempranillo	Barrique	Spanien
263	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique, 12 Monate	Deutschland, Franken
267	2007	unbekannt	Spätburgunder	Barrique, 1/2 neues Fass, 1/2 altes Fass	Deutschland, Franken
268	2008	unbekannt	Domina	Chips, Nobile Sweet	Deutschland, Franken
276	2009	unbekannt	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
278	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
282	2007	unbekannt	Regent-Dornfelder	Chips	Deutschland, Franken
283	2008	unbekannt	Acolon-Spätburgunder	Chips	Deutschland, Franken
285	2005	unbekannt	Rotwein	Holzfass	Italien, Piemont
289	2008	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
298		unbekannt		Barrique	Deutschland, Baden
300	2003	authentisch	Chardonnay	2,5 g/L Chips im Most, Vergär. im Glasballon	Deutschland, Rheinland-Pfalz
301	2003	authentisch	Chardonnay	Barrique-Allier, gebr., 20 min gedämpft	Deutschland, Rheinland-Pfalz
302	2003	authentisch	Chardonnay	Barrique-Allier, gebr., 40 min gedämpft	Deutschland, Rheinland-Pfalz
303	2003	authentisch	Chardonnay	Gebr. Barrique, ausgehobelt, neu get.	Deutschland, Rheinland-Pfalz
304	2003	authentisch	Chardonnay	Neues Barrique, 1. Bel., Allier	Deutschland, Rheinland-Pfalz
306	2009	authentisch	Weißer Burgunder	Chips, 3g/L	Deutschland, Rheinland-Pfalz
307	2009	authentisch	Weißer Burgunder	Chips, 3g/L, nach BSA	Deutschland, Rheinland-Pfalz
308		authentisch	Cabernet Dorsa	Maischegärung nach Saftabzug u. Chips	Deutschland, Franken
309		authentisch	Cabernet Dorsa	Maischegär. nach Saftabzug + Chips	Deutschland, Franken

311	authentisch	Cabernet Dorsa	Maischeerh. + Chips	Deutschland, Franken
313	authentisch	Domina	Maischegär., 20% Saftabzug + 5 g/L Chips unget.	Deutschland, Franken
314	authentisch	Regent	Chips, nach Gärung, 2g/L	Deutschland, Franken
325	unbekannt	Silvaner	Barrique	Deutschland, Franken
327	authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland
328	authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland
330	authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland
332	authentisch	Lemberger	Chips, franz., 3 g/L zum Most	Deutschland
333	authentisch	Lemberger	Chips, franz., 3 g/L nach BSA	Deutschland
334	unbekannt	Lemberger	Chips, franz., 3 g/L zum Most, im gebr. Barrique	Deutschland
336	authentisch	Schwarzriesling	Chips, amerik., 4 g/L nach BSA	Deutschland
337	authentisch	Schwarzriesling	Chips, amerik., 40 g/L nach BSA	Deutschland
340	authentisch	Silvaner	Chips, amerik., 1,5 g/L, Mitverg.	Deutschland
341	authentisch	Silvaner	Chips, amerik., 1,5 g/L nach BSA	Deutschland
344	unbekannt	Acolon	Barrique	Deutschland, Franken
345	unbekannt	Spätburgunder	Chips	Deutschland, Franken
349	unbekannt	Dornfelder	Barrique	Deutschland, Rheinhessen
351	B-authentisch	Dornfelder	Chips	Deutschland, Franken
361	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Baden
362	unbekannt		Barrique	Spanien
363	unbekannt		Barrique	Spanien
368	unbekannt	Chardonnay	Barrique	Deutschland, Franken
369	unbekannt	Dornfelder	Barrique	Deutschland, Pfalz
370	unbekannt	Malbec	Barrique	Argentinien
379	unbekannt	Dornfelder	Barrique	Deutschland, Pfalz
383	unbekannt	Shiraz	Barrique	Afrika
384	B-authentisch	Spätburgunder	Chips	Deutschland
386	unbekannt	Silvaner	Barrique	Deutschland, Franken

388	2010	unbekannt	Cabernet Sauvignon	Barrique	Chile, Valle del Maule
392	2007	B-authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland, Württemberg
393	2007	B-authentisch	Merlot	Barrique	Deutschland, Württemberg
394	2007	B-authentisch		Barrique	Deutschland, Württemberg
395	2008	B-authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland, Württemberg
396	2008	B-authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland, Württemberg
397	2008	B-authentisch	Merlot	Barrique	Deutschland, Württemberg
398	2007	B-authentisch	Merlot	Barrique	Deutschland, Württemberg
399	2007	B-authentisch	Clevner	Barrique	Deutschland, Württemberg
400	2008	B-authentisch	Zweigelt	Barrique	Deutschland, Württemberg
402	2007	B-authentisch	Lemberger	Barrique	Deutschland, Württemberg
403	2007	B-authentisch	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Württemberg
404	2009	B-authentisch	Regent	Barrique	Deutschland, Württemberg
406	2009	B-authentisch	Portugieser	Barrique	Deutschland, Franken
407	2010	B-authentisch	Dornfelder	Maischegär, Nobile sweet, 7,5 kg/hL, 91 d	Deutschland
408	2010	B-authentisch	Cabernet Dorsa	Maischegär, American Blend 7,5 kg/hL, 91 d	Deutschland, Württemberg
409	2010	B-authentisch	Lemberger	Maischeerh., Best Oak, unget., 10 kg/hL, 137 d	Deutschland, Württemberg
410	2009	B-authentisch	Rotwein	Maischeerh., Oakyvin AM 50%+FM 50%, 0,66 kg/hL, 183 d	Deutschland, Württemberg
411	2010	B-authentisch	Dornfelder	Maischeerh., Oakyvin AM 0,35 kg/hL, 30 d	Deutschland, Württemberg
412	2010	B-authentisch	Rotwein	Maischeerh., Oakyvin AM 54%+FM 4, 0,5 kg/hL, 30 d	Deutschland, Württemberg
413	2010	B-authentisch	Lemberger	Maischeerh., Oakyvin FM, 0,5 kg/hL, 30 d	Deutschland, Württemberg
414	2010	B-authentisch	Rotwein	Maischeerh., Oakyvin DM, 0,5 kg/hL, 30 d	Deutschland, Württemberg
415	2010	B-authentisch	Lemberger	Maischeerh., Oakyvin AM, 0,2 kg/hL, 30 d	Deutschland, Württemberg
416	2010	B-authentisch	Zweigelt	Maischeerh., Oakyvin AM, 0,4 kg/hL, 30 d	Deutschland, Württemberg
417	2010	B-authentisch	Trollinger	Maischeerh., Best Oak, NT, 0,1 kg/hL, 10 d	Deutschland, Württemberg
418	2010	B-authentisch	Trollinger	Maischeerh., Best Oak, NT, 0,1 kg/hL, 10 d	Deutschland, Württemberg

419	2010	B-authentisch	Lemberger	Maischeerh., Best Oak, NT, 0,1 kg/hL, 14 d	Deutschland, Württemberg
420	2010	B-authentisch	Trollinger	Maischeerh., Best Oak, NT, 0,1 kg/hL, 14 d	Deutschland, Württemberg
421	2010	B-authentisch	Trollinger	Maischeerh., Best Oak, NT, 0,1 kg/hL, 14 d	Deutschland, Württemberg
422	2010	B-authentisch	Lemberger	Maischeerh., Best Oak, NT, 0,1 kg/hL	Deutschland, Württemberg
423	2010	B-authentisch	Dornfelder	Best Oak (65%), Nobile (13%), Oakyvin, 0,1 kg/hL	Deutschland, Württemberg
424	2010	B-authentisch	Acolon	Best Oak (64%), Nobile (36%), 0,6 kg/hL	Deutschland, Württemberg
425	2009	B-authentisch	Portugieser	Chips	Deutschland, Württemberg
426	2010	B-authentisch	Acolon	Chips	Deutschland, Württemberg
427	2010	B-authentisch	Rose	Chips	Deutschland, Württemberg
429	2008	unbekannt		Barrique	Italien
430		unbekannt		Barrique	Spanien
432	2009	unbekannt	Domina	Barrique	Deutschland, Franken
434	2009	unbekannt	Spätburgunder	Barrique	Deutschland, Franken
435	2009	unbekannt	Regent	Barrique	Deutschland, Franken
436	2009	unbekannt	Pino Noir	Barrique	Deutschland, Franken
437	2008	unbekannt	Schwarzriesling	Barrique	Deutschland, Franken

Tabelle A.3: Übersicht über die Weine, die mittels ^1H NMR gemessen wurden und zur Modellbildung eingesetzt wurden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Magdalena Klein geb. Müller
Geburtstag:	11.09.1981
Geburtsort:	Bad Neustadt a.d. Saale
Wohnort:	Freising
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Schul Ausbildung

09/1988 – 07/1992	Grundschule Salz
09/1992 – 06/2001	Rhön-Gymnasium Bad Neustadt a.d. Saale Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/2001 – 03/2002	Georg August Universität Göttingen Fachrichtung: Geowissenschaften
04/2002 – 08/2004	Julius Maximilians Universität Würzburg Fachrichtung: Lebensmittelchemie
09/2004 – 03/2005	Umeå Universitet (Schweden) Fachrichtung: Food Design
04/2005 – 04/2006	Julius Maximilians Universität Würzburg Fachrichtung: Lebensmittelchemie Abschluss: 1. Staatsexamen

- 06/2006 – 08/2007 Bayerisches Landesamt für Gesundheit
und Lebensmittelsicherheit,
Standorte: Würzburg, Erlangen, Oberschleißheim
Ausbildung zum 2. Staatsexamen
Abschluss: 2. Staatsexamen
- 08/2007 – 05/2012 Promotionsstudium an der Technischen Universität
Carolo Wilhelmina Braunschweig,
durchgeführt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit
und Lebensmittelsicherheit, Standort: Würzburg

Berufserfahrung

- seit 09/2011 Bayerisches Landesamt für Umwelt, Standort: Augsburg,
Referat 74, Organische Analytik

Ort, Datum

Unterschrift